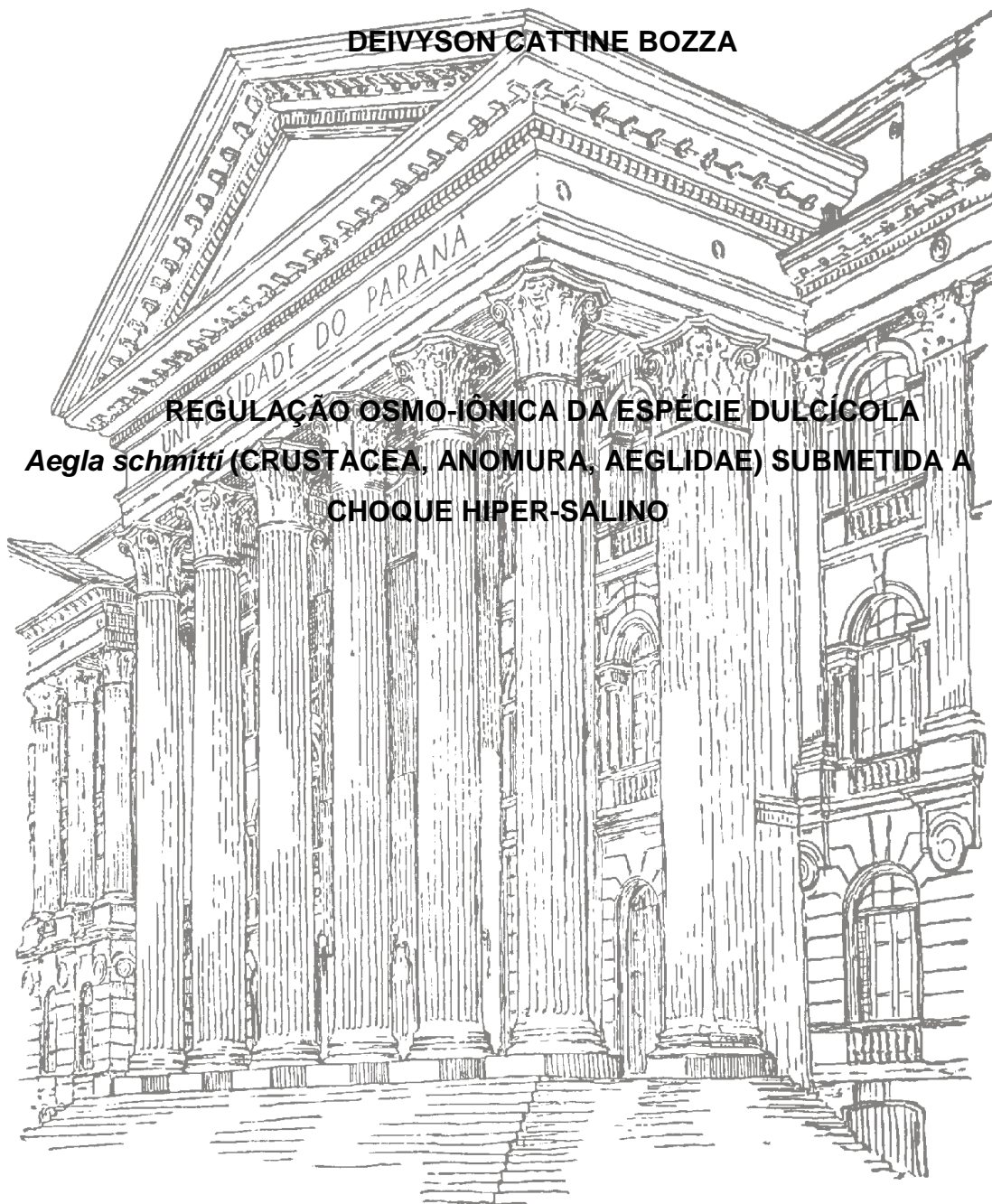


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DEIVYSON CATTINE BOZZA

**REGULAÇÃO OSMO-IÔNICA DA ESPÉCIE DULCÍCOLA
Aegla schmitti (CRUSTACEA, ANOMURA, AEGLIDAE) SUBMETIDA A
CHOQUE HIPER-SALINO**



CURITIBA

2016

DEIVYSON CATTINE BOZZA

REGULAÇÃO OSMO-IÔNICA DA ESPÉCIE DULCÍCOLA

Aegla schmitti (CRUSTACEA, ANOMURA, AEGLIDAE) SUBMETIDA A
CHOQUE HIPER-SALINO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Fisiologia, do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Viviane Prodocimo

CURITIBA

2016



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **DEIVYSON CATTINE BOZZA** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de fevereiro de 2016.

Professora Doutora Luciana Rodrigues de Souza Bastos
INPA - Membro Titular

Professora Doutora Ana Lúcia Tararthuch
UFPR - Membro Titular

Professora Doutora Viviane Prodócimo
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Prof^a. Dra. Viviane Prodocimo, pela amizade, pelos ensinamentos, pela orientação, por acreditar em mim, por ter me iniciado na osmorregulação e por ter me ajudado na execução desse trabalho.

À Prof^a. Dra. Carolina Arruda Freire pela amizade, pelos conselhos e por ser um exemplo de professora e pesquisadora.

Ao Leonardo de Paula Rios pelas conversas no laboratório, pela amizade, pela ajuda nos experimentos e nas coletas em Bocaiúva do Sul.

Às doutorandas Giovanna C. Castellano e Juliane Ceron pela amizade e ajuda nos experimentos de anidrase carbônica.

Aos amigos do LFCO Eloisa Pinheiro, Felipe Brandalise, Guilherme Torres, Isis Danniele, Natascha Wosnick e Thiago Occhi pela amizade, pelas risadas e pelo convívio nesses dois anos de mestrado.

À Minha avó, Nair Lemos Cattine *in memória*, a melhor professora que eu tive em toda a minha vida, por ter me educado e por me incentivar a estudar desde pequeno.

À Minha mãe, Déborah Cattine Bozza, por estar sempre me apoiando nos momentos difíceis da vida.

À Universidade Federal do Paraná pela minha formação, pelo meu crescimento profissional, pelas amizades que fiz e, principalmente, por ter mudado o rumo da minha vida e me possibilitar trabalhar com a pesquisa científica.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia por terem contribuído com a minha formação e o meu aprendizado.

À CAPES pela bolsa concedida durante esses dois anos de mestrado.

“Nada em biologia faz sentido exceto à luz da Evolução”.

Theodosius Dobzhansky

RESUMO

Os crustáceos anomuros do gênero *Aegla* ocorrem em água doce há aproximadamente 74 milhões de anos. O objetivo desse estudo foi avaliar a plasticidade osmorregulatória da espécie dulcícola *Aegla schmitti* através da determinação de limites de tolerância ao aumento de salinidade e da participação de mecanismos fisiológicos. Os animais foram expostos à água doce (controle) e às salinidades de 15‰, 20‰, 25‰ e 35‰ pelos períodos de um, cinco e dez dias e a taxa de sobrevivência da espécie foi determinada. Como a taxa de sobrevivência foi reduzida na salinidade de 35‰ após um dia de exposição, foi realizado um experimento de exposição a essa salinidade por doze horas. Após os experimentos foram medidas as concentrações iônicas (Na^+ , K^+ , Cl^- e Mg^{2+}) e a osmolalidade da hemolinfa; a atividade da enzima anidrase carbônica nas brânquias e o teor hídrico no músculo abdominal. *Aegla schmitti* mostrou que ainda preserva mecanismos osmorregulatórios para sobreviver em águas salinas e pode ser considerada eurialina, uma vez que apresentou grande plasticidade osmorregulatória, conseguindo sobreviver por até dez dias nas salinidades de 15‰, 20‰ e 25‰ e por até doze horas na salinidade de 35‰. Essa espécie também mostrou dois padrões de respostas diferentes, quando exposta à salinidades entre 20‰ e 25‰, sendo capaz de osmoconformar a osmolalidade da sua hemolinfa após cinco dias e hiporregular após um dia (entre 21‰ e 25‰) e dez dias (entre 23‰ e 25‰). No geral, os íons sódio e cloreto aumentaram junto com o aumento da osmolalidade da hemolinfa. O potássio foi o único íon que diminuiu a sua concentração após cinco dias na salinidade de 15‰ em comparação aos tempos de um e dez dias e na salinidade de 20‰ após cinco dias em comparação a um dia. Essa diminuição da concentração de potássio pode estar relacionada com a função desse íon na Regulação Isosmótica Intracelular. A concentração de magnésio aumentou com o aumento da salinidade e também com o maior tempo de exposição. O teor hídrico muscular manteve-se inalterado, exceto na salinidade de 25‰ onde houve uma redução após cinco dias de exposição, mostrando que essa espécie ainda consegue regular o volume celular, mesmo com a elevação da osmolalidade da hemolinfa. Esse estudo também foi o primeiro a medir a atividade da enzima anidrase carbônica de uma espécie da família Aeglidae. A atividade dessa enzima manteve-se inalterada, mesmo com o aumento da osmolalidade da hemolinfa em todas as salinidades e todos os tempos de exposição, possivelmente devido a função que essa enzima realiza no equilíbrio ácido-base. A única exceção ocorreu na salinidade de 35‰ após doze horas, quando a atividade da anidrase carbônica reduziu 63,3% em relação à água doce. Esse estudo foi extremamente importante para entender melhor os mecanismos fisiológicos envolvidos na osmorregulação dos crustáceos anomuros do gênero *Aegla*.

Palavras-chave: Água doce, anidrase carbônica, crustáceos, osmorregulação, salinidade

ABSTRACT

The anomurans crustaceans of the genus *Aegla* occur in fresh water for about 74 million years. The aim of this study was to evaluate the osmoregulatory plasticity of the freshwater species *Aegla schmitti* by determining limits of tolerance to increased salinity and the participation of physiological mechanisms. The animals were exposed to fresh water (control) and salinities of 15‰, 20‰, 25‰ and 35‰ for periods of one, five and ten days, and the survival rate of the species was determined. As the survival rate was reduced salinity of 35‰ after a day of exposure, was performed an experiment of exposure to this salinity for twelve hours. After the experiments were measured ionic concentrations (Na^+ , K^+ , Cl^- and Mg^{2+}) and the osmolality of the hemolymph; the activity of the enzyme carbonic anhydrase in the gills and the water content in the abdominal muscle. *Aegla schmitti* showed that preserves osmoregulatory mechanisms to survive in saline waters and can be considered euryhaline, since showed great osmoregulatory plasticity, managing to survive for up to ten days on the salinity of 15‰, 20‰ and 25‰ and up to twelve hours in salinity 35‰. This species also showed two different patterns of responses when exposed to salinity of 20‰ and 25‰, being able to osmoconformer of their hemolymph osmolality after five days and hipo-regulate after one day (between 21‰ and 25‰) and ten days (between 23‰ and 25‰). In general, the sodium and chloride ions increased with increasing hemolymph osmolality. The potassium is the only ion concentration decreased after five days in salinity of 15‰ compared to the times of one and ten days and the salinity of 20‰ after five days compared with a day. This decrease in potassium concentration can be related to the function of this ion in the Isosmotic Intracellular Regulation. The magnesium concentration increased with increasing salinity and also with longer exposure time. Muscle water content remained unchanged, except in salinity of 25‰ where there was a reduction after five days of exposure, showing that this species can still regulate cell volume, even with increasing of the hemolymph osmolality. This study was also the first to measure the activity of the enzyme carbonic anhydrase of a kind of family Aeglidae. The activity of the enzyme remained unchanged even with increasing of hemolymph osmolality in all salinities and all exposure times, possibly due to this enzyme function that performs the acid-base balance. The only exception occurred in salinity of 35‰ after twelve hours, when the activity of the carbonic anhydrase reduced 63.3% compared to freshwater. This study was extremely important to better understand the physiological mechanisms involved in osmoregulation of anomurans crustaceans the genus *Aegla*.

Key words: freshwater, carbonic anhydrase, crustaceans, osmoregulation, salinity

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 - Modelo hipotético para absorção de sal em água doce nas brânquias de crustáceos hiper-reguladores fortes..... | 5 |
| FIGURA 2 - Relações filogenéticas entre crustáceos da Ordem Decapoda..... | 6 |
| FIGURA 3 - Exemplar de <i>Aegla schmitti</i> | 9 |
| FIGURA 4 - Decurso temporal da sobrevivência (%) de <i>Aegla schmitti</i> submetida à água doce (A) (n=9) e às salinidades de 15‰ (B) (n=9), 20‰ (C) (n=9), 25‰ (D) (n=9) e 35‰ (E) (n=9) por dez dias..... | 15 |
| FIGURA 5 - Variação das concentrações da osmolalidade (mOsm/kg H ₂ O), do sódio (mM), do cloreto (mM), do potássio (mM) e do magnésio (mM) da hemolinfa e teor hídrico do tecido muscular (%) de <i>Aegla schmitti</i> expostos por uma dia (A), cinco dias (B) e dez dias (C) a água doce (n=6-9), e as salinidades de 15‰ (n=6-9), 20‰ (n=6-9), 25‰ (n=6-9)..... | 21 |
| FIGURA 6 - Osmolalidade da hemolinfa (média ± erro padrão) de <i>Aegla schmitti</i> exposta à água doce (n= 6) e às salinidades de 15‰ (n= 7-9), 20‰ (n= 8-9) e 25‰ (n= 6-8) durante um, cinco e dez dias..... | 22 |
| FIGURA 7. Variação das concentrações da osmolalidade (mOsm/kg H ₂ O), do sódio (mM), do cloreto (mM), do potássio (mM) e do magnésio (mM) da hemolinfa e teor hídrico do tecido muscular (%) de <i>Aegla schmitti</i> expostos por doze horas à água doce (n= 6-9) e à salinidade de 35‰ (n= 6-9)..... | 22 |
| FIGURA 8 - Atividade da enzima Anidrase Carbônica nas brânquias (média ± erro padrão, AAC/mg de proteína) de <i>Aegla schmitti</i> exposta à água doce (n= 6-9) e às salinidades de 15‰ (n= 6-9), 20‰ (n= 6-9) e 25‰ (n= 6-9) durante um, cinco e dez dias..... | 23 |
| FIGURA 9. Atividade da enzima Anidrase Carbônica nas brânquias (média ± erro padrão, AAC/mg de proteína) de <i>Aegla schmitti</i> exposta à água doce (n= 6) e à salinidade de 35‰ (n= 8)..... | 24 |

SUMÁRIO

| | | |
|-----|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 | Órgãos osmorregulatórios em crustáceos..... | 2 |
| 1.2 | Mecanismos osmorregulatórios e adaptações em água doce..... | 4 |
| 1.3 | Crustáceos dulcícolas da Ordem Decapoda..... | 6 |
| 1.4 | Família Aeglidae..... | 7 |
| 1.5 | Hipótese..... | 10 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 10 |
| 2.1 | Objetivo Geral..... | 10 |
| 2.2 | Objetivo Específico..... | 10 |
| 3. | MATERIAL E MÉTODOS..... | 11 |
| 3.1 | Coleta e aclimação dos crustáceos em laboratório..... | 11 |
| 3.2 | Protocolo Experimental..... | 11 |
| 3.3 | Amostras da hemolinfa e dos tecidos..... | 12 |
| 3.4 | Dosagens da hemolinfa..... | 12 |
| 3.5 | Teor Hídrico..... | 13 |
| 3.6 | Atividade da Anidrase Carbônica..... | 13 |
| 3.7 | Análise Estatística..... | 14 |
| 4. | RESULTADOS..... | 14 |
| 4.1 | Taxa de Sobrevivência..... | 14 |
| 4.2 | Osmolalidade..... | 15 |
| 4.3 | Sódio..... | 16 |
| 4.4 | Cloreto..... | 17 |
| 4.5 | Potássio..... | 18 |
| 4.6 | Magnésio..... | 19 |
| 4.7 | Teor Hídrico..... | 20 |
| 4.8 | Anidrase Carbônica..... | 23 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 24 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 35 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 36 |

1. INTRODUÇÃO

Os animais que vivem em ambientes aquáticos desenvolveram, ao longo da evolução, a capacidade de manter a homeostase osmótica e iônica do líquido extracelular (LEC) através dos mecanismos de osmorregulação, ou seja, da regulação das concentrações de soluto e balanço hídrico essenciais para sua sobrevivência (PÉQUEUX, 1995; CAMPBELL; REECE, 2010).

De acordo com sua capacidade osmorregulatória, as espécies aquáticas podem ser classificadas como osmoconformadoras ou osmorreguladoras. Todos os osmoconformadores são animais marinhos (CAMPBELL; REECE, 2010), capazes de manter o líquido extracelular (LEC) isosmótico em relação ao meio externo (água onde vivem) através da redução de gradientes osmóticos e alta permeabilidade dos epitélios de interface. Para manter a homeostase, esses animais realizam Regulação Isosmótica Intracelular (RII), que é responsável pela manutenção do volume intracelular através de ajustes na concentração de osmólitos intracelulares, como aminoácidos livres, peptídeos, K^+ e Ca^{2+} (PÉQUEUX, 1995; MCNAMARA *et al.*, 2004). Os animais osmorreguladores mantêm a osmolalidade do líquido extracelular constante, independente das variações do meio externo. Eles apresentam baixa permeabilidade dos epitélios, realizam absorção ativa de sal nas espécies dulcícolas (que envolve a participação de enzimas como Na^+, K^+ -ATPase, H^+ -ATPase e Anidrase Carbônica) ou secreção de sal nas espécies marinhas. Esse mecanismo de manutenção da homeostase do LEC é chamado Regulação Anisomótica Extracelular (RAE) (FLORKIN, 1962; PÉQUEUX, 1995).

Os animais aquáticos também podem ser classificados avaliando-se sua tolerância em relação à variação de salinidade do ambiente. Os que conseguem tolerar grandes variações de concentração salina no ambiente onde vivem são chamados de eurialinos, e os que possuem tolerância limitada à variação de salinidade são chamados de estenoalinos. Deve-se ressaltar que esta última classificação tem mais sentido quando usada de forma comparativa, e que todas estas classificações dependem da salinidade do ambiente e do tempo de exposição a esta salinidade (PÉQUEUX, 1995; WILLMER; STONE; JOHNSTON, 2005).

Os crustáceos são invertebrados que podem ser encontrados nos mais diversos ambientes e a maioria das espécies vivem no ambiente marinho, mas também existem espécies dulcícolas, estuarinas e terrestres (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). As espécies que conseguiram colonizar com sucesso a água doce sofreram, ao longo da evolução, adaptações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas, além de desenvolverem a capacidade de hiper-regular a sua hemolinfa para sobreviver em ambientes com baixas concentrações de sal (AUGUSTO *et al.*, 2009).

A maioria dos crustáceos (aquáticos, terrestres e semi-terrestres) são osmorreguladores. Os crustáceos osmorreguladores aquáticos podem ser subdivididos em hiporreguladores e hiperreguladores. Os hiporreguladores têm a capacidade de se manter hiposmótico em relação ao ambiente onde vivem, mantendo a concentração osmótica do LEC menor do que a do meio externo, como acontece com alguns decápodos, copépodos e isópodos marinhos (PÉQUEUX, 1995; WILLMER; STONE; JOHNSTON, 2005; FREIRE; ONKEN; MCNAMARA, 2008). Os hiperreguladores se mantêm hiperosmóticos em relação ao ambiente, quando a concentração osmótica do LEC é maior do que a do meio externo, como acontece com todas as espécies dulcícolas (PÉQUEUX, 1995; KIRSCHNER, 2004; FREIRE; ONKEN; MCNAMARA, 2008). Os crustáceos hiperreguladores podem ainda ser divididos em fortes, como por exemplo os caranguejos *Eriocheir sinensis* e *Dilocarcinus pagei*, os camarões palemonídeos do gênero *Macrobrachium* e a família Aeglididae, que são capazes de absorver sal de água doce; ou fracos, como os caranguejos *Carcinus maenas* e *Chasmagnathus granulata*, que são capazes de absorver sal apenas de água salobra, mas não de água doce (PÉQUEUX, 1995; KIRSCHNER, 2004; FREIRE; ONKEN; MCNAMARA, 2008).

1.1 Órgãos osmorregulatórios em crustáceos

Os principais órgãos responsáveis pela osmorregulação em crustáceos são as brânquias (PÉQUEUX, 1995). Nos caranguejos e nos siris as brânquias posteriores e as brânquias anteriores diferem-se morfológicamente e funcionalmente. As brânquias anteriores apresentam um epitélio mais fino e são responsáveis pela respiração e as brânquias posteriores apresentam um epitélio

mais grosso e são responsáveis pela absorção ativa de NaCl (COPELAND; FITZJARRELL, 1968; MANTEL; FARMER, 1983; LUQUET *et al.*, 2002a; FREIRE; ONKEN; MCNAMARA, 2008). Vários estudos realizados com caranguejos e siris mostram que a atividade das enzimas Na⁺,K⁺-ATPase (NKA) e anidrase carbônica (AC) são maiores nas brânquias posteriores do que nas brânquias anteriores confirmando o papel das brânquias posteriores nos processos de osmorregulação (e.g. NEUFELD; HOLLIDAY; PRITCHARD, 1980; HENRY *et al.*, 2002, KIRSCHNER, 2004; SERRANO; HALANYCH; HENRY, 2007; FREIRE; ONKEN; MCNAMARA, 2008; LARSEN *et al.*, 2014).

Porém, nos camarões e nos lagostins não foram observadas diferenças na atividade dessas duas enzimas nas brânquias posteriores e anteriores (WHEATLY; HENRY, 1987; WILDER *et al.*, 2000; JASMANI; JAYASANKAR; WILDER, 2008; HENRY *et al.*, 2012). Segundo Lucu e Towle (2003), essas diferenças funcionais encontradas nas brânquias anteriores e posteriores parecem ser características exclusivas do táxon Brachyura e podem não ser encontradas em outros táxons de crustáceos.

Os crustáceos também possuem glândulas antenais, também chamadas de glândulas verdes ou glândulas maxilares, que são responsáveis pela produção de urina (LARSEN *et al.*, 2014). No geral, os caranguejos dulcícolas produzem urina isosmótica em relação à hemolinfa, como por exemplo *Potamon niloticus* (SHAW, 1959), *Potamon edulis* (HARRIS; MICALLEF, 1971), *Eriocheir sinensis* (RATHMAYER; SIEBERS, 2001) e *Dilocarcinus pagei* (AUGUSTO *et al.*, 2007b). Porém, os lagostins e algumas espécies de camarões são capazes de produzir urina diluída em relação à hemolinfa como por exemplo *Austropotamobius pallipes pallipes* (RIEGEL, 1964), *Orconectes limosus* (RIEGEL, 1964), *Pacifastacus leniusculus* (KERLEY; PRITCHARD, 1967), *P. clarkii* (SARVER; FLYNN; HOLLIDAY, 1994), *Astacus leptodactylus* (KHODABANDEH *et al.*, 2005), *Syncaris pacifica* (BORN, 1968), *Macrobrachium australiense* (DENNE, 1968) e *Macrobrachium rosenbergii* (STERN; BORUT; COHEN, 1987). A produção de urina diluída em grande quantidade significou uma vantagem para a conquista de meios mais diluídos, como a água doce, devido a quantidades maiores de água excretada nesses ambientes (LOCKWOOD, 1977).

1.2 Mecanismos osmorregulatórios e adaptações em água doce

Os animais que vivem em água doce são hiperosmóticos em relação ao meio em que vivem e, por isso, enfrentam dois problemas osmorregulatórios que são: a entrada de água, devido ao gradiente osmótico e perda de sal para o meio em que vivem (RANDALL; BURGGREN; FRENCH; 2000).

Para solucionar esses problemas osmorregulatórios, os crustáceos de água doce desenvolveram algumas adaptações para esses ambientes com baixa salinidade como a redução da permeabilidade da superfície corporal à água e aos sais; o aumento da produção de urina diluída, para compensar a entrada de água; e absorção ativa de sal, principalmente NaCl, para compensar a perda passiva de sal (MANTEL; FARMER; 1983; HENRY *et al.*, 2012).

Os hiperreguladores fortes possuem células branquiais ricas em mitocôndrias que possuem transportadores apicais e basolaterais, responsáveis pela absorção de NaCl em água doce (e.g. PÉQUEUX, 1995; FREIRE; ONKEN; MCNAMARA, 2008; HENRY *et al.*, 2012; MCNAMARA; FARIA, 2012). Os transportadores localizados na região apical dos hiperreguladores fortes são os canais de Na^+ , o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e a H^+ -ATPase; e os transportadores localizados na região basolateral são a Na^+, K^+ -ATPase, os canais de Cl^- e os canais de K^+ (FIGURA 1) (FREIRE; ONKEN; MCNAMARA, 2008; HENRY *et al.*, 2012; MCNAMARA; FARIA, 2012; LARSEN *et al.*, 2014). Além desses transportadores, essas células também possuem a enzima anidrase carbônica citosólica, responsável pela hidratação do CO_2 e produção dos íons H^+ e HCO_3^- (FIGURA 1). A anidrase carbônica citosólica desempenha várias funções celulares e está envolvida tanto no equilíbrio ácido-base, quanto na absorção de sal em crustáceos eurialinos (PÉQUEUX, 1995; HENRY *et al.*, 2012; MCNAMARA; FARIA, 2012; LARSEN *et al.*, 2014; MITCHELL; HENRY, 2014; ALI *et al.*, 2015) (FIGURA 1).

A absorção do sódio ocorre devido a atividade da H^+ -ATPase que bombeia H^+ (proveniente da atividade da anidrase carbônica citosólica) para o meio externo (água doce) e gera um gradiente eletroquímico que favorece a entrada dos íons Na^+ através dos canais de Na^+ apicais. Em seguida, o Na^+ é absorvido para a hemolinfa através da atividade da Na^+, K^+ -ATPase basolateral. Já o cloreto, é absorvido

independentemente do sódio, através do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, que troca o íon Cl^- pelo íon HCO_3^- (produzido pela atividade da anidrase carbônica citosólica). Por fim, o Cl^- é absorvido para a hemolinfa através de canais de Cl^- basolaterais. Em geral, os crustáceos hiperreguladores fortes utilizam mecanismos iguais ou muito semelhantes a esses para absorver NaCl em água doce (ONKEN, RIENSTENPATT, 1998; FREIRE; ONKEN; MCNAMARA, 2008; MCNAMARA; FARIA, 2012; LARSEN *et al.*, 2014).

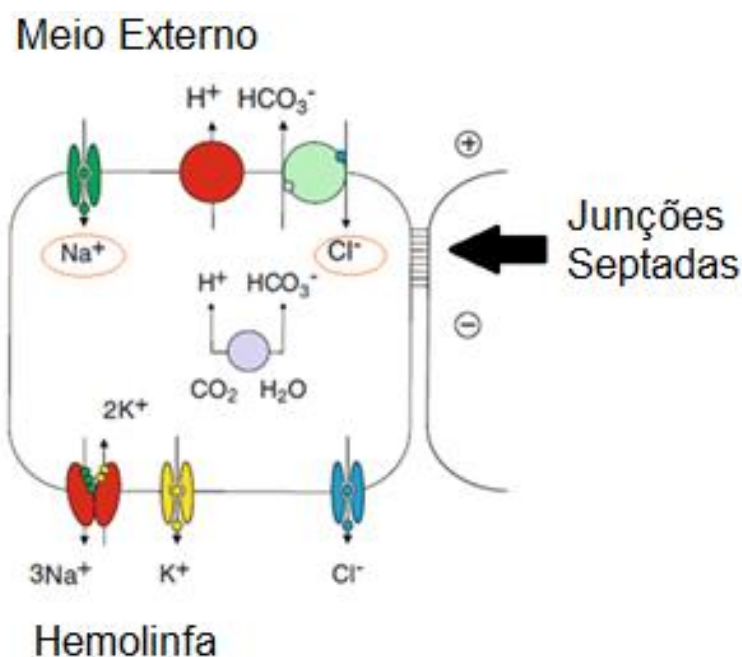


FIGURA 1. Modelo hipotético para absorção de sal em água doce nas brânquias de crustáceos hiperreguladores fortes. Baseado em McNamara e Faria 2012.

Além dos transportadores de membrana organizados para realizar a absorção de sal em água doce, os animais dulcícolas ao longo da evolução desenvolveram soluções para reduzir a permeabilidade corporal à água e aos íons. A redução da permeabilidade a água ocorre de duas maneiras: as junções septadas (FIGURA 1) impedem o transporte paracelular e a ausência de aquaporinas na membrana plasmática impede o transporte transcelular (PÉQUEUX, 1995; RANDALL; BURGGREN; FRENCH; 2000; FREIRE; ONKEN; MCNAMARA, 2008; HENRY *et al.*, 2012; MCNAMARA; FARIA, 2012).

Nos crustáceos dulcícolas não ocorre o transporte paracelular de íons, devido às junções septadas (FIGURA 1) serem mais espessas do que as junções presentes em crustáceos estuarinos e marinhos (FREIRE; ONKEN; MCNAMARA, 2008; MCNAMARA; FARIA, 2012). Essas junções mais espessas impedem que os crustáceos dulcícolas percam íons como o Na^+ para o meio em que vivem.

1.3 Crustáceos dulcícolas da Ordem Decapoda

Dos crustáceos pertencentes à Ordem Decapoda, apenas os táxons Dendrobranchiata, Caridea, Brachyura, Astacida e Aeglidae conseguiram invadir com sucesso o ambiente dulcícola, sendo que apenas os táxons Astacida e Aeglidae vivem exclusivamente na água doce (FIGURA 2) (e.g. PÉREZ-LOSADA *et al.*, 2004; CRANDALL; BUHAY, 2008; DE GRAVE; CAI; ANKER, 2008; YEO *et al.*, 2008; TAVARES; SEREJO; MARTIN, 2009; FARIA; AUGUSTO; MCNAMARA, 2011).

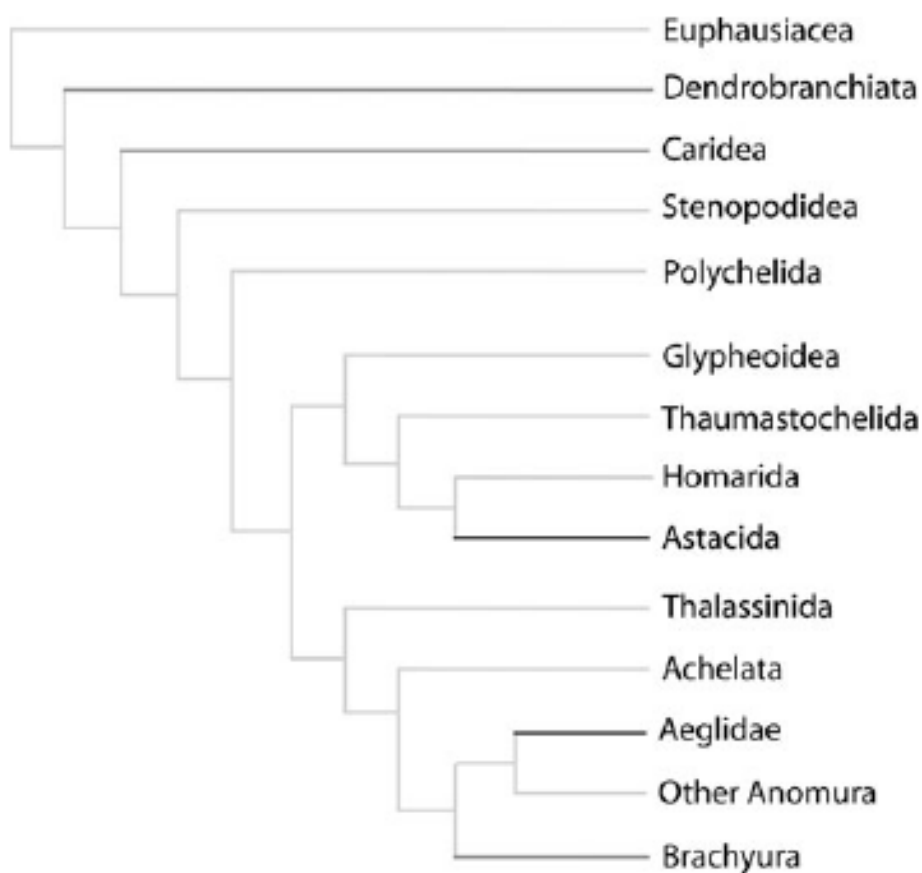


FIGURA 2. Relações filogenéticas entre crustáceos da Ordem Decapoda. Baseado em Faria; Augusto e McNamara 2011.

Todos os crustáceos da Ordem Decapoda apresentam brânquias que possuem um eixo central com vasos sanguíneos aferente e eferente, mas com diferenças morfológicas na distribuição dos ramos ou filamentos. Por isso, as brânquias dos crustáceos Decapoda são divididas em três tipos diferentes: dendrobrânquias, que são exclusivas do táxon Dendrobranchiata; filobrânquias, que estão presentes nos táxons Brachyura e Caridea, e também em algumas espécies de Anomura; e tricobrânquias, que são encontradas nos táxons dulcícolas Astacida e Aeglidae, mas também estão presentes em táxons marinhos, como Homarida, Thalassinida e Stenopodidea (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005; FREIRE; ONKEN; MCNAMARA, 2008).

1.4 Família Aeglidae

A família Aeglidae, Dana 1852 pertence a Infra-ordem Anomura, e é a única família dessa Infra-ordem exclusivamente de água doce. A família Aeglidae é formada por apenas três gêneros, sendo dois fósseis (*Hamuriaegla* e *Protoaegla*) e apenas um gênero atual, *Aegla*.

O gênero *Aegla* é endêmico da América do Sul e se distribui pelos rios da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai (MARTIN; ABELE, 1986). Além de rios, esses crustáceos também podem ser encontrados em arroios e cavernas, escondidos embaixo de rochas, em águas bastante oxigenadas e límpidas (DALOSTO; SANTOS, 2011).

Todas as espécies do gênero *Aegla* são hololimnéticas e atualmente são descritas na literatura 77 espécies (SANTOS *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2015), sendo registradas dez espécies no Estado do Paraná: *Aegla castro*, *Aegla lata*, *Aegla marginata*, *Aegla parana*, *Aegla schmitti*, *Aegla parva*, *Aegla paulensis*, *Aegla meloi*, *Aegla loyolai* e *Aegla lancinhas* (BOND-BUCKUP, 2003; SANTOS *et al.*, 2015).

A maioria das espécies são classificadas como onívoras e generalistas, podendo também apresentar comportamento de canibalismo (SANTOS *et al.*, 2008). Apresentam uma grande importância ecológica na cadeia alimentar, pois se alimentam de insetos, oligoquetas, plantas submersas, algas, fungos, copépodos,

moluscos, tardígrados e rotíferos (BAHAMONDE; LÓPEZ, 1961; RODRIGUES; HEBLING, 1978; BUENO; BOND-BUCKUP, 2004; SANTOS *et al.*, 2008; WILLINER, 2010), além de servirem de alimento para peixes, aves, rãs e lontras (ARENAS, 1976; SANTOS *et al.*, 2008; CASSINI *et al.*, 2009).

A origem do grupo ainda é incerta, sendo que alguns autores sugerem que o grupo se originou no Oceano Pacífico (ORTMANN, 1902; PÉREZ-LOSADA *et al.*, 2004) e outros sustentam a origem no Oceano Atlântico (SCHMITT, 1942; RINGUELET, 1949; MORRONE; LOPRETTO, 1994). Porém, Feldmann (1984) descobriu um fóssil marinho de *Hamuriaegla glaessneri* na Nova Zelândia, de aproximadamente 75 milhões de anos, sugerindo que a origem do grupo ocorreu na região Indo-Pacífico e depois se dispersou pela América do Sul. Alguns anos depois, esse mesmo pesquisador descobriu um fóssil em sedimentos marinhos de *Protaegla miniscula* no México, de aproximadamente 110 milhões de anos (FELDMANN *et al.*, 1998). Através de uma análise molecular utilizando 64 espécies e subespécies da família Aeglidae, Pérez-Losada *et al.* (2004) sugeriu que o grupo tem uma origem marinha e a espécie *Aegla papudo* é considerada a mais primitiva, mas não se pode inferir a idade mínima em que ocorreu a invasão para o ambiente dulcícola.

A espécie em estudo, *Aegla schmitti* Hobbs III, 1979 (FIGURA 3) se distribui pelos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, nas Bacias do Iguaçu, Litorânea e Ribeira do Iguape (BOND-BUCKUP; BUCKUP, 1994). Estudos sobre a capacidade osmorregulatória de crustáceos do gênero *Aegla* ainda são muito escassos na literatura, existindo apenas quatro trabalhos de quatro espécies diferentes: *Aegla longirostri* (COGO; SANTOS, 2007), *Aegla schmitti* (FREIRE *et al.*, 2008), *Aegla franca* (FARIA; AUGUSTO; MCNAMARA, 2011) e *Aegla parana* (FREIRE *et al.*, 2013).

A espécie *A. longirostri* quando exposta a água salobra (salinidades de até 20‰) sobreviveu por 4 dias, indicando resquícios de processos fisiológicos de seus ancestrais marinhos que levam a tolerância a ambientes salinos (COGO; SANTOS, 2007). *Aegla schmitti* exposta à salinidade de 15‰, durante sete horas, conseguiu manter a osmolalidade de sua hemolinfa relativamente constante, e a porcentagem de água no músculo permaneceu inalterada (FREIRE *et al.*, 2008).

Aproximadamente 85% dos indivíduos de *A. franca* conseguem sobreviver em salinidades entre 15 e 21‰ por dez dias. Em salinidade de 28‰, apenas 25%

dos indivíduos sobrevivem por esse mesmo período de tempo. Já em salinidade de 35‰, após um período de apenas um dia, apenas 7% dos indivíduos sobrevivem. Em relação à regulação anisomótica extracelular, *A. franca* é um forte hiperregulador em salinidades de até 15‰ e não é capaz de hiporregular a osmolalidade da hemolinfa em nenhuma salinidade entre <0,5‰ (água doce) e 31‰ (FARIA; AUGUSTO; MCNAMARA, 2011). Em relação à Regulação Isomótica Intracelular a concentração de aminoácidos livres, presentes no tecido muscular de *A. franca*, aumentou acentuadamente em desafios hiperosmóticos, cerca de 3,5 vezes em salinidade de 25‰, em dois dias, sem reduzir a hidratação do tecido (FARIA; AUGUSTO; MCNAMARA, 2011).

Experimentos *in vitro* utilizando tecido muscular da espécie *A. parana* submetida ao choque hiperosmótico, reduziu seu peso úmido muscular entre 10 e 20%, trinta minutos após ser exposta ao choque. Quando foi adicionado furosemida (inibidor de NKCC) ao tecido muscular, em condições hiperosmóticas, houve uma diminuição de peso úmido de *A. Paraná*, sugerindo que essa espécie depende do cotransportador NKCC para diminuir a perda de volume quando exposta a choques hiperosmóticos (FREIRE et al., 2013).

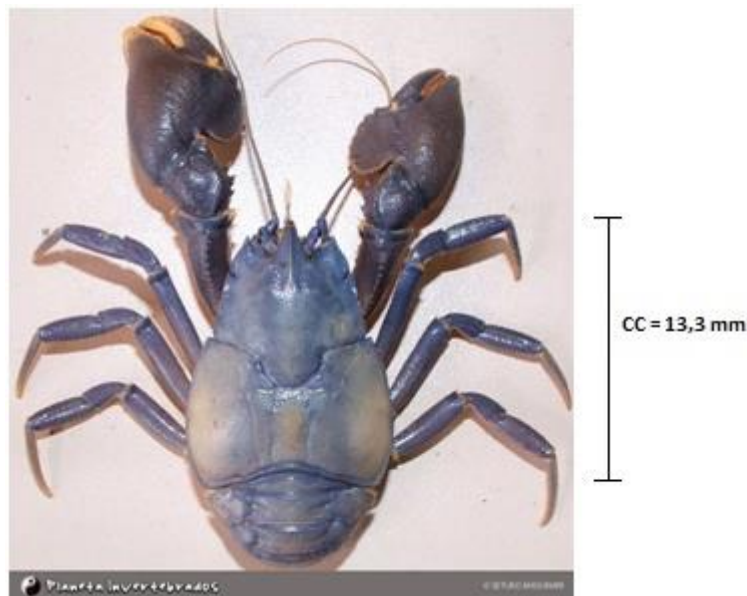


FIGURA 3. Exemplar de *Aegla schmitti*. Foto: Setuko Masunari (www.planeta-invertebrados.com.br)

A família Aeglidæ tem origem no ambiente marinho e estima-se que esse grupo ocupa o ambiente dulcícola há pelo menos 74 milhões de anos, estando o clado onde encontra-se a espécie *A. schmitti* datando de aproximadamente 33

milhões de anos (PÉREZ-LOSADA *et al.*, 2004). Por apresentarem longo tempo de evolução em água doce, e pouco conhecimento em relação à plasticidade osmorregulatória do gênero *Aegla*, pretende-se avaliar os limites de tolerância ao choque hiper-salino e a participação de mecanismos osmorregulatórios, com a finalidade de avaliar manutenção de processos fisiológicos de osmorregulação oriundos de seus ancestrais marinhos. Esse trabalho também será o primeiro a medir a atividade de uma enzima (Anidrase Carbônica) relacionada com a absorção de sal em água doce de uma espécie do gênero *Aegla*.

1.5 Hipótese

A espécie *A. schmitti*, que possui longo tempo de evolução em água doce, perdeu os mecanismos de osmorregulação, responsáveis por garantir a sobrevivência desse crustáceo por longos períodos em águas salinas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar a plasticidade osmorregulatória do crustáceo dulcícola *A. schmitti*, através da determinação de limites de tolerância ao aumento de salinidade e da participação de mecanismos osmorregulatórios fundamentais para enfrentar desafios salinos.

2.2 Objetivo Específico

- Avaliar as concentrações osmóticas e iônicas do líquido extracelular e teor de água no tecido muscular em resposta a alteração de salinidade do meio;
- Avaliar o papel da enzima Anidrase Carbônica nas brânquias de *A. schmitti* em resposta a alteração de salinidade do meio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e aclimação dos crustáceos em laboratório

Os crustáceos de água doce *Aegla schmitti* foram coletados no Rio Capivari, Bocaiúva do Sul, Paraná (25°9'57.22"S e 49°6'46.5"W), todos em período de intermuda, com o auxílio de puçás. Em seguida, os crustáceos foram transportados para o laboratório, em caixas térmicas contendo água do local da coleta.

No laboratório, durante o período de aclimação de sete dias, os crustáceos foram mantidos em um aquário de 38 litros, com água doce filtrada e aeração constante. Os animais foram alimentados com filé de peixe em dias alternados. A água do aquário foi trocada todos os dias. A temperatura média da água foi de $18,8 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ durante o período de aclimação.

3.2 Protocolo Experimental

Após o período de aclimação, exemplares de *A. schmitti*, medindo em média $13,30 \pm 0,28$ mm de CC (comprimento da carapaça - da ponta do rostro até a borda superior da carapaça) ($n=118$), foram transferidos diretamente para os tratamentos experimentais em recipientes plásticos ($n=3$ por recipiente) contendo aproximadamente 2,5 litros de água e com aeração constante. Foram realizados quinze tratamentos diferentes (5 salinidades x 3 tempos). As salinidades dos tratamentos foram: Água Doce (controle), 15‰, 20‰, 25‰ e 35‰; os tempos dos tratamentos foram: um dia, cinco dias e dez dias. Antes desses quinze tratamentos foi realizado um piloto com o tempo de dez dias para verificar a sobrevivência. Além do experimento de sobrevivência, também foi realizado mais um experimento, onde a espécie *A. schmitti* foi submetida à salinidade de 35‰ no tempo de doze horas, já que nesse tempo de exposição a taxa de sobrevivência foi alta (88,89%) em relação a taxa de sobrevivência nos outros tempos, que foram de 55,56% em um dia, 11,11% em cinco dias e 0% em dez dias.

Os experimentos foram realizados várias vezes até que se obtivessem no mínimo seis e no máximo nove crustáceos em cada grupo experimental. Durante o

experimento os crustáceos não foram alimentados. A água foi trocada totalmente a cada dois dias, nos experimentos de cinco e de dez dias. Após o período experimental os crustáceos foram sacrificados por técnica de crioanestesia por imersão em gelo picado, em seguida foram coletadas amostras de hemolinfa, as brânquias e fragmentos do músculo abdominal.

3.3 Amostras da hemolinfa e dos tecidos

Após a crioanestesia, foram coletadas amostras da hemolinfa ($\approx 50\mu\text{l}$) de cada crustáceo. As amostras foram retiradas da punção da membrana artrodial de um dos pereiópodos, usando uma seringa de insulina acoplada a uma agulha e transferidas para tubos de Eppendorfs de 0,5 ml. Em seguida, as amostras da hemolinfa foram congeladas a -20°C .

As brânquias e o músculo abdominal foram seccionados com o auxílio de uma tesoura e uma pinça. Esses tecidos foram transferidos para tubos de Eppendorfs de 0,5 ml e congelados a -80°C . As brânquias foram utilizadas para ensaio da atividade da anidrase carbônica e o músculo foi utilizado para determinar o teor hídrico.

3.4 Dosagens da hemolinfa

As amostras da hemolinfa foram utilizadas para determinar a osmolalidade e as concentrações iônicas de Na^+ , K^+ , Cl^- e Mg^{+2} . A osmolalidade foi determinada com um micro-osmômetro de pressão de vapor Vapro 5520 (Wescor, Logan, E.U.A.). As concentrações dos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) foram determinadas com um fotômetro de chama micronal B462, em amostras diluídas na proporção 1:400 (AD, 15‰, 20‰ e 25‰) e 1:800 (35‰). As concentrações dos íons cloreto (Cl^-) e magnésio (Mg^{+2}) foram determinadas utilizando kits comerciais Labtest e espectrofotômetro Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech. Todas as concentrações iônicas foram dosadas em duplicatas.

3.5 Teor Hídrico

O teor hídrico (%) foi determinado através de amostras do músculo abdominal (Peso úmido = $5,7 \pm 0,35$ mg, $n=82$) dos crustáceos. Primeiro, as amostras foram pesadas para determinar o peso úmido (Pu). Em seguida, as amostras foram transferidas para dentro de uma estufa, com temperatura de 60°C durante 24 horas. Após esse período, as amostras foram pesadas novamente para determinar o peso seco (Ps). O teor hídrico foi calculado através da fórmula:

$$\text{Th (\%)} = [(Pu - Ps) / Pu] \times 100$$

3.6 Atividade da Anidrase Carbônica

O método de Vitale *et al.* (1999) foi utilizado para determinar a atividade da enzima anidrase carbônica. As brânquias foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas em 10% P/V (peso/volume) de tampão (225 mM de manitol, 75 mM de sacarose, 10 mM de Tris base, pH de 7,4). O peso médio das brânquias foi de $13,34 \pm 1,01$ mg ($n= 89$). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 13.400 xg durante 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade da enzima.

Foi medido a queda do pH de cada amostra, com a utilização de 7,5 ml do mesmo tampão da homogeneização, que foi adicionado a 0,05 ml do sobrenadante homogeneizado. Em seguida, também foi adicionado 1 ml de água deionizada saturada com CO₂ a 2,5°C, nos tempos 0, 4, 8, 12, 16 e 20 segundos, para gerar uma reta de regressão linear. A queda de pH foi medida com um pHmetro de bancada (inoLAB pH level 1 da WTW®, Alemanha) e o tempo foi medido com um cronômetro. A inclinação da reta de regressão linear corresponde a Taxa de Reação Catalisada (TC). A Taxa de Reação Não Catalisada (TNC) foi obtida da mesma forma que a Taxa de Reação Catalisada, substituindo a amostra homogeneizada por 0,05 ml do mesmo tampão. A Atividade da Anidrase Carbônica (AAC) foi calculada através da fórmula:

$$\text{AAC} = [\text{TC} / \text{TNC} - 1] / \text{mg proteína total}$$

O método de Bradford (1976) foi utilizado para determinar a concentração de proteínas totais das brânquias.

3.7 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados na forma de média \pm erro padrão da média. As médias foram avaliadas através de análises de variância de duas vias (TWO-ANOVA) (fatores: salinidade X tempo) seguido por um teste *post hoc* de Tukey. Os testes de normalidade e de homogeneidade das variâncias foram realizados antes de cada ANOVA. Todas as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Taxa de sobrevivência

Aegla schmitti expostas à água doce (FIGURA 4A) e às salinidades de 15‰ (FIGURA 4B), 20‰ (FIGURA 4C) e 25‰ (FIGURA 4D) após dez dias apresentaram a taxa de sobrevivência de 88,89%. Porém, quando expostos à salinidade de 35‰ a taxa de sobrevivência foi de 88,89% após doze horas, e após um dia de exposição a taxa de sobrevivência foi de 55,56% (FIGURA 4E). No segundo dia de exposição à salinidade de 35‰, a taxa de sobrevivência foi de apenas 22,22%; no quinto dia exposto à essa mesma salinidade a taxa de sobrevivência foi de 11,11% e no sétimo dia de exposição todos os indivíduos estavam mortos (FIGURA 4E).

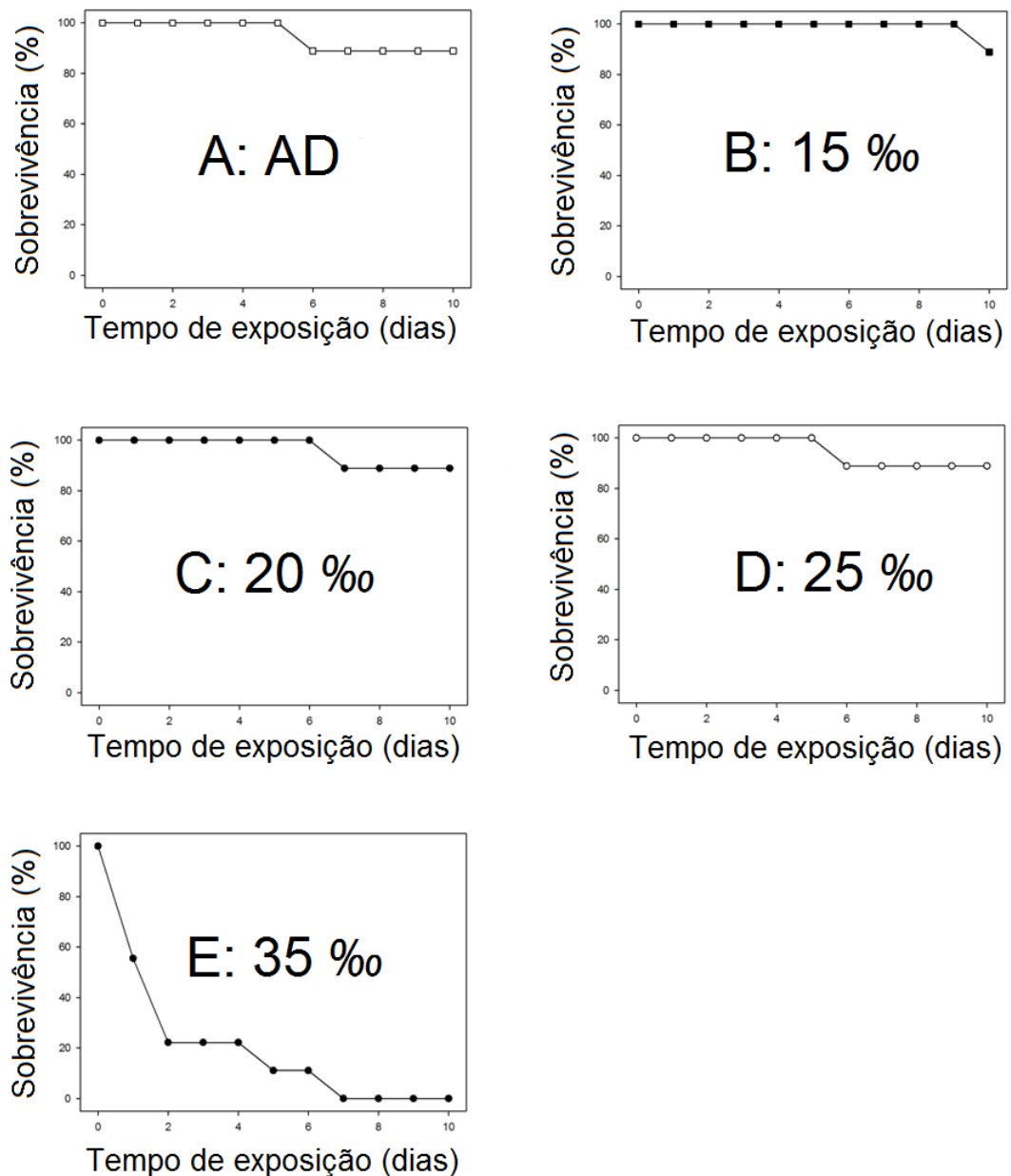


FIGURA 4. Decurso temporal da sobrevivência (%) de *Aegla schmitti* exposta à água doce (A) (n=9) e as salinidades de 15‰ (B) (n=9), 20‰ (C) (n=9), 25‰ (D) (n=9) e 35‰ (E) (n=9) por dez dias.

4.2 Osmolalidade

A osmolalidade da hemolinfa de *A. schmitti* aumentou nas salinidades de 15‰ ($568 \pm 15,36$ mOsm/kg H₂O), de 20‰ ($619 \pm 14,14$ mOsm/kg H₂O) e de 25‰ ($627 \pm 21,66$ mOsm/kg H₂O) quando comparados à osmolalidade dos animais expostos a condição controle em água doce ($490 \pm 15,78$ mOsm/kg H₂O), após um dia de exposição (FIGURA 5A; FIGURA 6).

Após cinco dias de exposição a elevação de salinidade, a osmolalidade da hemolinfa aumentou em 15‰ ($584 \pm 21,26$ mOsm/kg H₂O) e em 20‰ ($601 \pm 24,31$ mOsm/kg H₂O) em comparação ao controle em água doce ($487 \pm 12,99$ mOsm/kg H₂O) (FIGURA 5B; FIGURA 6). Nos animais expostos a 25‰ ($806 \pm 28,41$ mOsm/kg H₂O) houve uma elevação da osmolalidade da hemolinfa em comparação ao controle e às salinidades de 15‰ e de 20‰ (FIGURA 5B; FIGURA 6). Os animais expostos à salinidade de 25‰ por cinco dias apresentaram aumento da osmolalidade da hemolinfa quando comparado aos animais expostos à essa mesma salinidade por um dia ($627 \pm 21,66$ mOsm/kg H₂O) e por dez dias ($688 \pm 18,61$ mOsm/kg H₂O) (FIGURA 5A; FIGURA 5B; FIGURA 5C; FIGURA 6).

A osmolalidade da hemolinfa aumentou nas salinidades de 15‰ ($544 \pm 11,7$ mOsm/kg H₂O), de 20‰ ($684 \pm 15,14$ mOsm/kg H₂O) e de 25‰ ($688 \pm 18,61$ mOsm/kg H₂O) quando comparados à hemolinfa dos animais em água doce ($457 \pm 20,75$ mOsm/kg H₂O), após dez dias de exposição (FIGURA 5C; FIGURA 6). Nos animais expostos às salinidades de 20‰ e de 25‰ a osmolalidade da hemolinfa aumentou em comparação aos animais expostos a salinidade de 15‰ (FIGURA 5C; FIGURA 6). Os animais expostos à salinidade de 20‰ por dez dias apresentaram elevação da osmolalidade da hemolinfa quando comparada aos animais expostos por um dia e por cinco dias (FIGURA 5A; FIGURA 5B; FIGURA 5C; FIGURA 6). Os animais expostos à salinidade de 25‰ por dez dias apresentaram aumento da osmolalidade quando comparada aos animais expostos a essa salinidade por cinco dias (FIGURA 5B; FIGURA 5C; FIGURA 6).

A osmolalidade da hemolinfa aumentou de $490 \pm 15,78$ mOsm/kg H₂O (controle em água doce) para $725 \pm 23,26$ mOsm/kg H₂O nos animais expostos à salinidade de 35‰ por doze horas (FIGURA 7).

4.3 Sódio

A concentração de sódio da hemolinfa manteve-se constante na água doce ($204 \pm 7,3$ mM) até a salinidade de 15‰ ($199 \pm 2,74$ mM) (FIGURA 5A) após um dia de exposição. Porém, a concentração de sódio da hemolinfa aumentou nas salinidades de 20‰ ($236 \pm 4,93$ mM) e de 25‰ ($265 \pm 3,54$ mM) em comparação à

água doce ($204 \pm 7,3$ mM), após um dia de exposição (FIGURA 5A). Na salinidade de 25‰ a concentração de sódio da hemolinfa foi elevada quando comparada a concentração de sódio dos animais em 20‰ (FIGURA 5A). A concentração de sódio na hemolinfa dos animais expostos a salinidade de 15‰ ($199 \pm 2,74$ mM) após um dia de exposição foi menor quando comparada a concentração dos animais expostos a essa salinidade por cinco dias ($221 \pm 5,08$ mM) e dez dias ($237 \pm 4,57$ mM) (FIGURA 5A; FIGURA 5B; FIGURA 5C).

A concentração de sódio da hemolinfa não se alterou significativamente na água doce ($203 \pm 8,14$ mM) até a salinidade de 15‰ ($221 \pm 5,08$ mM), após cinco dias de exposição (FIGURA 5B). Porém, a concentração de sódio da hemolinfa aumentou nos animais expostos às salinidades de 20‰ ($231 \pm 7,79$ mM) e de 25‰ ($250 \pm 9,4$ mM) em comparação ao controle em água doce ($203 \pm 8,14$ mM), após cinco dias de exposição (FIGURA 5B).

A concentração de sódio da hemolinfa aumentou na salinidade de 15‰ ($237 \pm 4,57$ mM) em comparação ao controle em água doce ($209 \pm 10,52$ mM), após dez dias de exposição (FIGURA 5C). A concentração de sódio da hemolinfa aumentou nas salinidades de 20‰ ($259 \pm 7,6$ mM) e de 25‰ ($269 \pm 3,75$ mM), quando comparada ao controle em água doce e à 15‰ (FIGURA 5C). O sódio da hemolinfa dos animais expostos a 20‰ por dez dias aumentou quando comparado ao sódio dos animais expostos aos tempos de um dia ($236 \pm 4,93$ mM) e de cinco dias ($231 \pm 7,79$ mM) (FIGURA 5A; FIGURA 5B; FIGURA 5C).

Da mesma forma que a osmolalidade, a concentração de sódio da hemolinfa aumentou nos animais expostos à salinidade de 35‰ ($332 \pm 8,72$ mM) por doze horas quando comparados ao controle em água doce ($204 \pm 7,3$ mM) (FIGURA 7).

4.4 Cloreto

A concentração de cloreto na hemolinfa de *A. schmitti* aumentou nas salinidades de 15‰ ($223 \pm 3,92$ mM), de 20‰ ($258 \pm 8,87$ mM) e de 25‰ ($266 \pm 7,63$ mM) em comparação a água doce ($178 \pm 4,31$ mM), após um dia de exposição (FIGURA 5A). A concentração de cloreto na hemolinfa também foi significativamente

maior nas salinidades de 20‰ e de 25‰ em comparação à salinidade de 15‰ (FIGURA 5A).

No tempo de exposição de cinco dias, a concentração de cloreto da hemolinfa aumentou nas salinidades de 15‰ ($239 \pm 11,68$ mM), de 20‰ ($270 \pm 11,29$ mM) e de 25‰ ($273 \pm 12,3$ mM), em comparação ao controle em água doce ($157 \pm 3,77$ mM) (FIGURA 5B). Na salinidade de 25‰ a concentração de cloreto aumentou significativamente em comparação a hemolinfa dos animais em 15‰ (FIGURA 5B).

Assim como ocorreu nos outros tempos, a concentração de cloreto da hemolinfa de *A. schmitti* aumentou nas salinidades de 15‰ ($225 \pm 3,31$ mM), de 20‰ ($262 \pm 6,77$ mM) e de 25‰ ($254 \pm 8,92$ mM), em comparação ao controle em água doce ($156 \pm 6,5$ mM), após dez dias de exposição (FIGURA 5C). Nas salinidades de 20‰ e 25‰ a concentração de cloreto foi significativamente maior do que na hemolinfa dos animais em 15‰ (FIGURA 5C).

Em *A. schmitti* exposta à salinidade de 35‰ durante doze horas ($344 \pm 9,9$ mM) a concentração de cloreto dobrou em comparação ao controle em água doce ($178 \pm 4,31$ mM) (FIGURA 7).

4.5 Potássio

A concentração de potássio não se alterou significativamente na água doce ($9,1 \pm 0,42$ mM) até à salinidade de 15‰ ($11,4 \pm 0,32$ mM), após um dia de exposição (FIGURA 5A). *Aegla schmitti* exposta às salinidades de 20‰ ($13,6 \pm 1,08$ mM) e de 25‰ ($12,4 \pm 0,71$ mM) por um dia elevou o potássio da hemolinfa quando comparado ao controle em água doce e à salinidade de 15‰ (FIGURA 5A). A concentração de potássio da hemolinfa dos animais expostos a 20‰ por um dia foi elevada em comparação aos animais expostos por cinco dias ($9,6 \pm 0,66$ mM) (FIGURA 5A; FIGURA 5B).

A concentração de potássio aumentou em 25‰ ($13,1 \pm 1,07$ mM) em comparação ao controle em água doce ($9,3 \pm 0,53$ mM), e às salinidades de 15‰ ($7,2 \pm 0,48$ mM) e de 20‰ ($9,6 \pm 0,66$ mM), após cinco dias de exposição (FIGURA

5B). A concentração de potássio na salinidade de 15‰ após de cinco dias foi menor do que a concentração de potássio nessa mesma salinidade após um dia ($11,4 \pm 0,32$ mM) e dez dias ($10,8 \pm 0,5$ mM) de exposição (FIGURA 5A; FIGURA 5B; FIGURA 5C).

A concentração de potássio manteve-se sem alterações significativas na água doce ($9,0 \pm 0,58$ mM) e nas salinidades de 15‰ ($10,8 \pm 0,5$ mM) e de 20‰ ($11,5 \pm 0,79$ mM), após dez dias de exposição (FIGURA 5C). A concentração de potássio da hemolinfa também aumentou na salinidade de 25‰ ($15,2 \pm 1,0$ mM), em comparação ao controle em água doce e às salinidades de 15‰ e de 20‰, nos animais expostos por dez dias (FIGURA 5C). Na salinidade de 25‰ ($15,2 \pm 1,0$ mM) a concentração de potássio foi maior do que a concentração dos animais expostos por um dia ($12,4 \pm 0,71$ mM) (FIGURA 5A; FIGURA 5C).

A concentração de potássio aumentou de $9,1 \pm 0,42$ mM na água doce para $17,5 \pm 0,86$ mM na água do mar (35‰) durante doze horas de exposição (FIGURA 7).

4.6 Magnésio

A concentração de magnésio não se alterou significativamente na água doce ($6,0 \pm 0,78$ mM) até a salinidade de 15‰ ($7,1 \pm 0,75$ mM), após um dia de exposição (FIGURA 5A). A concentração de magnésio da hemolinfa de *A. schmitti* exposta por um dia aumentou em 20‰ ($14,2 \pm 0,67$ mM) e em 25‰ ($15,5 \pm 0,56$ mM) em comparação ao controle em água doce (FIGURA 5A). A concentração de magnésio da hemolinfa dos animais em 15‰ ($7,1 \pm 0,75$ mM) após um dia de exposição é menor do que a concentração de magnésio nessa mesma salinidade após cinco dias ($11,5 \pm 0,6$ mM) e dez dias ($13,2 \pm 0,71$ mM) de exposição (FIGURA 5A; FIGURA 5B; FIGURA 5C).

Após cinco dias de exposição, a concentração de magnésio aumentou ≈ 3 vezes em 15‰ ($11,5 \pm 0,6$ mM) em comparação ao controle em água doce ($4,2 \pm 0,2$ mM) e aumentou ≈ 4 vezes em 20‰ ($14,6 \pm 1,17$ mM) e 25‰ ($15,3 \pm 0,73$ mM) em comparação ao controle (FIGURA 5B). Os animais expostos às salinidades de

20‰ e de 25‰ apresentaram maiores concentrações de magnésio na hemolinfa quando comparados aos animais em 15‰ (FIGURA 5B).

A concentração de magnésio aumentou ≈ 2 vezes nas salinidades de 15‰ ($13,2 \pm 0,71$ mM), de 20‰ ($14,8 \pm 1,07$ mM) e de 25‰ ($15,4 \pm 1,3$ mM) em comparação ao controle em água doce ($6,2 \pm 0,42$ mM), após dez dias de exposição (FIGURA 5C).

A concentração de magnésio da hemofinfa dos animais expostos à água do mar (35‰) aumentou 4 vezes ($24,8 \pm 1,04$ mM) em comparação ao controle em água doce ($6,0 \pm 0,78$ mM) após doze horas de exposição (FIGURA 7).

4.7 Teor Hídrico

O teor hídrico no músculo abdominal de *A. schmitti* não foi alterado frente a exposição a diferentes salinidades durante um dia (AD: $80,2 \pm 1,14$ %; 15‰: $78,35 \pm 0,39$ %; 20‰: $78,58 \pm 0,67$ %; 25‰: $79,32 \pm 1,2$ %) (FIGURA 5A).

Porém, no tempo de cinco dias, o teor hídrico muscular apresentou uma diminuição na salinidade de 25‰ ($75,05 \pm 0,7$ %) em comparação ao controle em água doce ($79,74 \pm 0,75$ %) (FIGURA 5B). Esse valor do teor hídrico em 25‰ também foi reduzido em comparação aos animais expostos à mesma salinidade nos tempos de um dia ($79,32 \pm 1,2$ %) e de dez dias ($80,67 \pm 0,9$ %) (FIGURA 5A; FIGURA 5B; FIGURA 5C).

O teor hídrico dos animais expostos às diferentes salinidades por dez dias não apresentou nenhuma alteração (AD: $81,1 \pm 0,58$ %; 15‰: $80,95 \pm 1,62$ %; 20‰: $79,21 \pm 1,17$ %; 25‰: $80,67 \pm 0,9$ %) (FIGURA 5C).

Não houve diferença entre o teor hídrico dos crustáceos expostos à salinidade de 35‰ por doze horas ($78,07 \pm 1,23$ %) em comparação ao controle em água doce ($80,2 \pm 1,14$ %) (FIGURA 7).

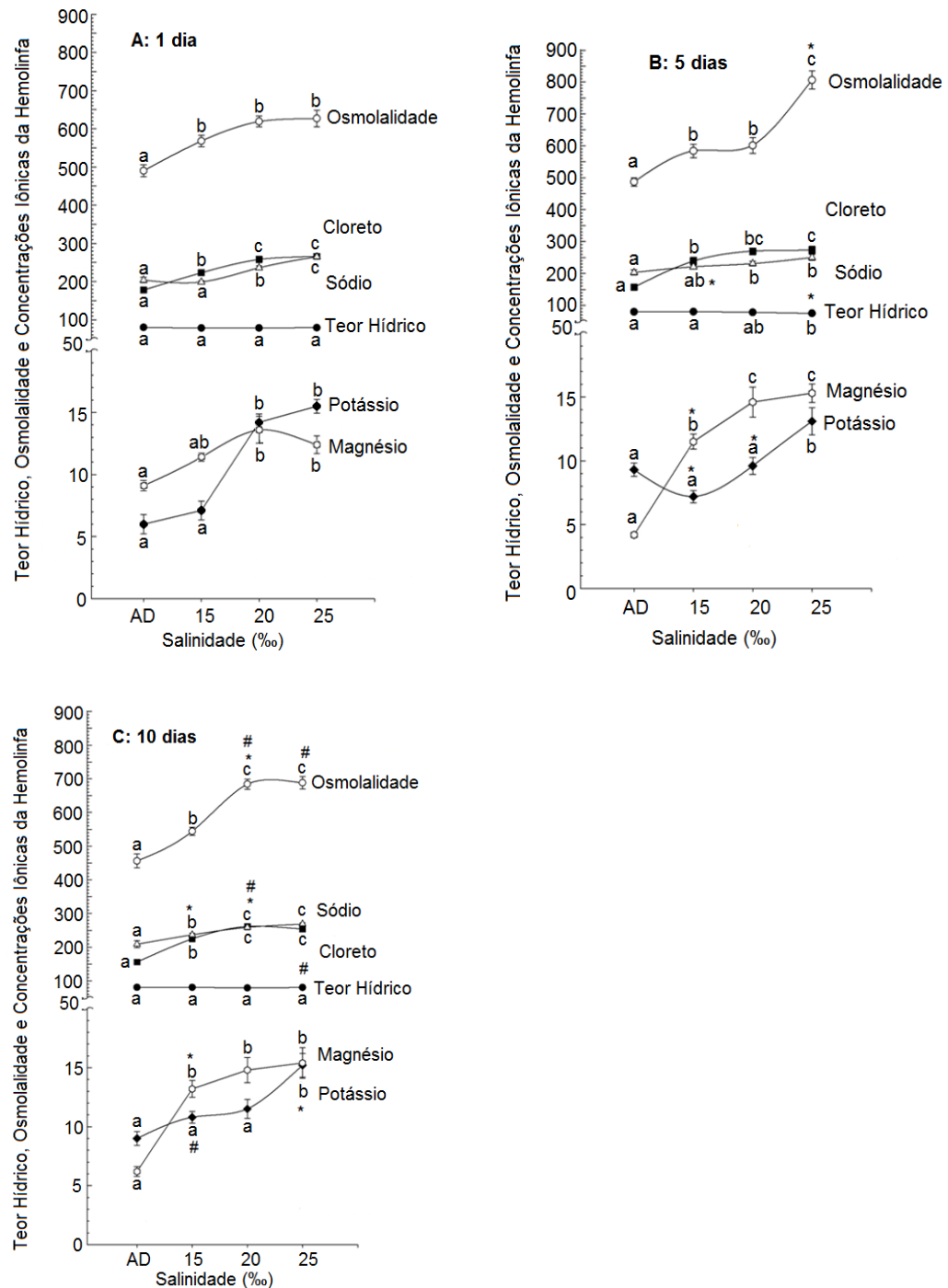


FIGURA 5. Variação das concentrações da osmolalidade (mOsm/kg H₂O), do sódio (mM), do cloreto (mM), do potássio (mM) e do magnésio (mM) da hemolinfa e teor hídrico do tecido muscular (%) de *Aegla schmitti* expostos por uma dia (A), cinco dias (B) e dez dias (C) a água doce (n= 6-9), e as salinidades de 15‰ (n= 6-9), 20‰ (n= 6-9), 25‰ (n= 6-9). Grupos que compartilham mesma letra não apresentam diferença estatística. * indicam diferença entre os animais expostos às diferentes salinidades por um dia e os tempos de cinco e dez dias. # indicam diferenças entre os animais expostos às diferentes salinidades por cinco dias e dez dias. P<0,05.

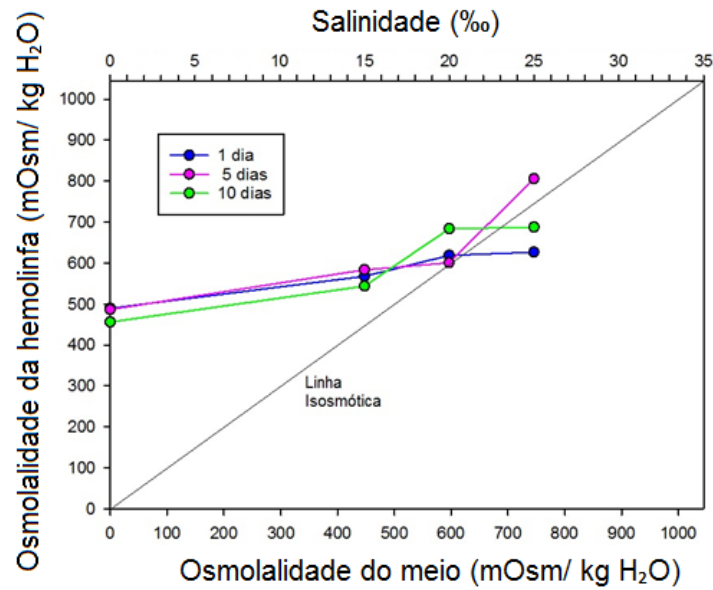


FIGURA 6. Osmolalidade da hemolinfa (média \pm erro padrão) de *Aegla schmitti* exposta à água doce (n= 6) e às salinidades de 15‰ (n= 7-9), 20‰ (n= 8-9) e 25‰ (n= 6-8) durante um, cinco e dez dias.

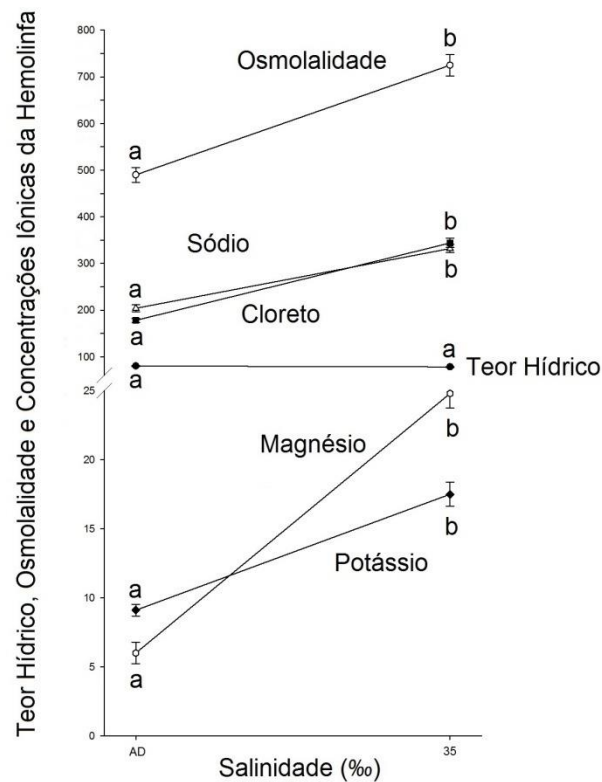


FIGURA 7. Variação das concentrações da osmolalidade (mOsm/kg H₂O), do sódio (mM), do cloreto (mM), do potássio (mM) e do magnésio (mM) da hemolinfa e teor hídrico do tecido muscular (%) de *Aegla schmitti* expostos por doze horas à água doce (n= 6-9) e à salinidade de 35‰ (n= 6-9). P<0,05.

4.8 Anidrase Carbônica

A atividade da anidrase carbônica branquial da *A. schmitti* foi semelhante em todas as salinidades: $2,2 \pm 0,19$ /mg de proteína (AD), $2,1 \pm 0,22$ / mg de proteína (15‰), $2,0 \pm 0,21$ /mg de proteína (20‰) e $2,0 \pm 0,35$ /mg de proteína (25‰), após um dia de exposição (FIGURA 8).

Após os tempos de exposição de cinco dias (AD - $2,1 \pm 0,13$ /mg de proteína; 15‰ - $2,2 \pm 0,32$ /mg de proteína; 20‰ - $2,2 \pm 0,31$ mg de proteína; 25‰ - $1,9 \pm 0,15$ mg de proteína) e de dez dias (AD - $2,1 \pm 0,19$ /mg de proteína; 15‰ - $2,0 \pm 0,2$ /mg de proteína; 20‰ - $2,0 \pm 0,3$ mg de proteína; 25‰ - $2,0 \pm 0,25$ de proteína) a atividade da anidrase carbônica também não teve diferença estatística entre todas as salinidades e os valores foram semelhantes aos encontrados no tempo de um dia (FIGURA 8). No entanto, nos crustáceos expostos à 35‰ por doze horas ($1,4 \pm 0,06$ /mg de proteína), a atividade da anidrase carbônica diminuiu em comparação ao controle em água doce ($2,2 \pm 0,19$ /mg de proteína) (FIGURA 9).

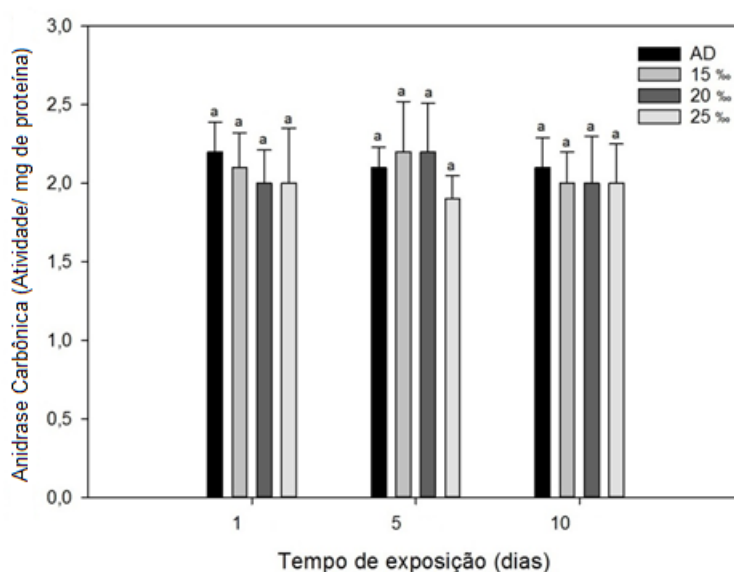


FIGURA 8. Atividade da enzima Anidrase Carbônica nas brânquias (média \pm erro padrão, AAC/mg de proteína) de *Aegla schmitti* exposta à água doce (n= 6-9) e às salinidades de 15‰ (n= 6-9), 20‰ (n= 6-9) e 25‰ (n= 6-9) durante um, cinco e dez dias. Letras iguais indicam ausência de diferenças significativas entre as condições experimentais. $P < 0,05$.

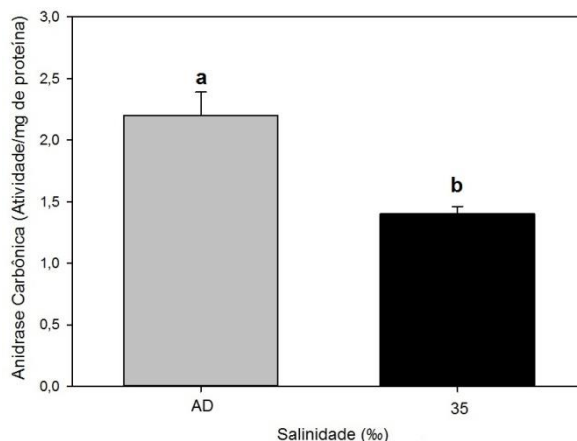


FIGURA 9. Atividade da enzima Anidrase Carbônica nas brânquias (média \pm erro padrão, AAC/mg de proteína) de *Aegla schmitti* exposta à água doce (n= 6) e à salinidade de 35‰ (n= 8). $P < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Aegla schmitti, um crustáceo anomuro hololimnético que habita ambientes dulcícolas há aproximadamente $33,2 \pm 1,8$ milhões de anos (PÉREZ-LOSADA *et al.*, 2004), apresentou de forma surpreendente taxa de sobrevivência de 88,89% quando exposto às salinidades de 15‰, 20‰ e 25‰ por dez dias, a mesma observada nos controles mantidos em água doce (AD). Após a exposição por um dia e por cinco dias a essas mesmas salinidades a taxa de sobrevivência foi de 100%, exceto na salinidade de 35‰, que foi de 55,56% e 11,11%, respectivamente. Resultados semelhantes a esses foram observados na espécie *Aegla franca*, que ocorre na região sudeste do Brasil (em riachos localizados entre as cidades de Franca-SP e Claraval-MG) (BUENO; SHIMIZU; ROCHA, 2007), submetida à salinidades de 14‰, de 21‰, de 28‰, de 35‰ e controle em água doce por dez dias, apresentando taxa de sobrevivência de 100% em água doce ($<0,5‰$); de aproximadamente 85% nas salinidades de 14‰ e de 21‰; e de 25% em 28‰ após dez dias de exposição (FARIA; AUGUSTO; MCNAMARA, 2011). Para a espécie *Aegla longirostri*, que ocorre nas regiões nordeste, central e leste do Rio Grande do Sul, Brasil (MARCHIORI; BARTHOLOMEI-SANTOS; SANTOS, 2014), a taxa de sobrevivência foi de 80% após a exposição de 4 dias à salinidade de 15‰ e de apenas 40% na salinidade de 20‰. A mortalidade foi de 100% na salinidade de 25‰, após 4 dias de exposição (COGO; SANTOS, 2007).

Quando exposta à água do mar (35‰), *A. schmitti* apresentou uma taxa de sobrevivência de 88,89% após doze horas e de 55,56% após um dia de exposição, aproximadamente 8 vezes maior do que *Aegla franca*, que apresentou uma taxa de sobrevivência de apenas 7%, quando exposta à essa mesma salinidade (FARIA; AUGUSTO; MCNAMARA, 2011). As espécies *A. schmitti* (presente estudo) e *A. franca* (FARIA; AUGUSTO; MCNAMARA, 2011) conseguem sobreviver por mais tempo na salinidade de 35‰ (pelo menos um indivíduo vivo após 6 dias de exposição) do que a espécie congênere *A. longirostri* (COGO; SANTOS, 2007), que não sobreviveu mais do que 30 horas nessa salinidade. Essas semelhanças e diferenças, observadas na taxa de sobrevivência dessas três espécies, sugerem que a espécie *A. schmitti* parece ser mais eurialina e preservar melhor a capacidade osmorregulatória para sobreviver em águas mais salinas, do que as espécies *A. franca* e *A. longirostri*.

Outros crustáceos decápodos hololimnéticos, como caranguejos, apresentam taxas de sobrevivência e de mortalidade semelhantes as espécies da família Aeglidae. O caranguejo hololimnético *Dilocarcinus pagei* consegue sobreviver por dez dias sem mortalidade em salinidades de 5 até 20‰. Na salinidade de 25‰, a mortalidade é de 20% após oito dias de exposição e na salinidade de 35‰ a maioria dos caranguejos morre após um dia (AUGUSTO *et al.*, 2007b).

Após um dia de exposição a salinidade de 15‰, a osmolalidade da hemolinfa de *A. schmitti* aumentou 15,9% ($568 \pm 15,36$ mOsm/kg H₂O e gradiente de 1,3:1) comparada a água doce ($490 \pm 15,78$ mOsm/kg H₂O e gradiente de 32,7:1), resultado semelhante ao encontrado para animais expostos por sete horas a essa salinidade, onde a osmolalidade da hemolinfa de *A. schmitti* aumentou 13% (de $453 \pm 6,3$ mOsm/kg H₂O e gradiente de 30,2:1 em água doce até $512 \pm 20,7$ mOsm/kg H₂O e gradiente de 1,1:1 na salindade de 15‰) (FREIRE *et al.*, 2008). Esses resultados mostram que, na salinidade de 15‰, a espécie *A. schmitti* não está conseguindo manter o gradiente entre o LEC e a água e por isso está absorvendo mais sal, principalmente o íon cloreto, uma vez que o sódio permaneceu inalterado nessa salinidade após um dia de exposição.

Na salinidade de 35‰ também houve um aumento na osmolalidade da hemolinfa após doze horas de exposição de $490 \pm 15,78$ mOsm/kg H₂O (gradiente

de 32,7:1 em água doce) para $725 \pm 23,26$ mOsm/kg H₂O (gradiente de 0,7:1 e aumento de 48%). Porém, diferentemente do que ocorreu na salinidade de 15‰ após um dia de exposição, a concentração de sódio da hemolinfa aumentou 62,7% e a concentração de cloreto aumentou 93,3%. O aumento na osmolalidade da hemolinfa na salinidade de 35‰ é causado pelo aumento na concentração de sódio e cloreto, que também alteram o gradiente entre o LEC e a água e impedem a manutenção da homeostase osmótica.

No tempo de exposição de cinco dias a diferentes salinidades, a espécie *A. schmitti* hiperregulou a osmolalidade da sua hemolinfa na água doce ($487 \pm 12,99$ mOsm/kg H₂O) até a salinidade de 20‰ ($601 \pm 24,31$ mOsm/kg H₂O) e conformou a sua hemolinfa na salinidade de 25‰ ($806 \pm 28,41$ mOsm/kg H₂O). A espécie *A. franca* mostrou um padrão semelhante também quando foi exposta durante cinco dias a diferentes salinidades, hiperregulando na água doce ($409,3 \pm 5,9$ mOsm/kg H₂O) até aproximadamente a salinidade de 25‰ (≈ 800 mOsm/kg H₂O) e conformando de 25‰ até 31‰ (916 mOsm/kg H₂O) (FARIA; AUGUSTO; MCNAMARA, 2011).

Outros crustáceos de água doce quando expostos a diferentes salinidades também mostraram o padrão de hiperregular em baixas salinidades e conformar em altas salinidades. O caranguejo hololimnético *Dilocarcinus pagei* hiperregulou a sua hemolinfa na água doce (420 ± 39 mOsm/kg H₂O) até a salinidade de 24‰ (744 mOsm/kg H₂O) e conformou de 24‰ até 35‰, após dez dias de exposição (AUGUSTO *et al.*, 2007b). O caranguejo diádromo *Eriocheir sinensis* hiperregulou a sua hemolinfa na água doce (≈ 600 mOsm/kg H₂O) até 21‰ (631 mOsm/kg H₂O) e conformou de 28‰ até 35‰, após três dias de exposição (1044 mOsm/kg H₂O) (WANG *et al.*, 2012). O lagostim *Procambarus clarkii* também hiperregulou a sua hemolinfa na água doce (387 ± 8 mOsm/kg H₂O) até ≈ 600 mOsm/kg H₂O e conformou de 600 mOsm/kg H₂O até ≈ 800 mOsm/kg H₂O após duas semanas de exposição (SARVER; FLYNN; HOLLIDAY, 1994). Todos esses trabalhos mostram que crustáceos hololimnéticos são fortes hiperreguladores na água doce e também em baixas salinidades, mas ainda são capazes de preservar mecanismos osmorregulatórios provenientes dos seus ancestrais marinhos para osmoconformar em altas salinidades.

Na salinidade de 25‰ *A. schmitti* mostrou uma resposta bifásica, pois a osmolalidade da hemolinfa de *A. schmitti* aumentou de $627 \pm 21,66$ mOsm/kg H₂O após um dia, para $806 \pm 28,41$ mOsm/kg H₂O após cinco dias, e diminuiu para $688 \pm 18,61$ mOsm/kg H₂O após dez dias de exposição. Uma explicação para esse aumento na osmolalidade da hemolinfa após cinco dias de exposição à salinidade de 25‰ quando comparados à essa mesma salinidade após um e dez dias, pode estar relacionada com o aumento de aminoácidos livres, pois assim como o sódio e o cloreto, os aminoácidos livres também podem contribuir para o aumento da osmolalidade (LIMA; MCNAMARA; TERRA, 1997). O aumento dos aminoácidos livres está relacionado com mecanismos de regulação de volume celular (RII), uma vez que esses osmólitos orgânicos ativam esses mecanismos com o objetivo de manter a composição e o volume intracelular isosmótico ao meio em que vivem e esse tipo de regulação celular é comumente encontrada em animais marinhos osmoconformadores (PÉQUEUX, 1995). A espécie *A. franca* aumentou a concentração de aminoácidos livres no músculo abdominal aproximadamente 3,5 vezes, de $18,2 \pm 1,7$ mmol/kg peso seco em água doce para $63,3 \pm 6,9$ mmol/kg peso seco na salinidade de 25‰, após dois dias de exposição (FARIA; AUGUSTO; MCNAMARA, 2011). Os aminoácidos livres no músculo abdominal contribuem 5,8% com a osmolalidade da hemolinfa de *A. franca* em água doce, aumentando 1,7 vezes, para 9,7% após cinco dias na salinidade de 25‰ (FARIA; AUGUSTO; MCNAMARA, 2011). Esse aumento de aminoácidos livres no músculo abdominal, após cinco dias de exposição na salinidade de 25‰, também foi encontrado no camarão diádromo *Macrobrachium amazonicum* (AUGUSTO *et al.*, 2007a). A concentração de aminoácidos livres no músculo dos crustáceos decápodos tende a diminuir com a diminuição da salinidade do meio em que eles vivem, ou seja, os crustáceos marinhos apresentam uma alta concentração de aminoácidos livres, os crustáceos estuarinos apresentam uma concentração intermediária e os crustáceos dulcícolas apresentam baixas concentrações de aminoácidos livres (MCNAMARA *et al.*, 2004; AUGUSTO *et al.*, 2007b). A baixa concentração de aminoácidos livres e a redução da osmolalidade da hemolinfa constituem efetivos parâmetros para se avaliar o grau de adaptação à água doce, sugerindo que espécies de crustáceos dulcícolas hololimnéticas apresentam baixas concentrações de aminoácidos livres,

pois possuem mecanismos eficientes de RAE e estão bem adaptadas à água doce (AUGUSTO *et al.*, 2007b).

Diferentemente de cinco dias, *A. schmitti* hiperregulou em água doce até 21‰ e hiporregulou de 21‰ até 25‰ em um dia, e hiperregulou em água doce até 23‰ e hiporregulou de 23‰ até 25‰ em dez dias. Assim como *A. schmitti*, o lagostim *Pacifastacus leniusculus* também mostrou padrões diferentes quando expostos a tempos diferentes. Quando *Pacifastacus leniusculus* foi exposto à salinidades diferentes por dois dias, hiperregulou da água doce até 14‰ e hiporregulou nas salinidades de 21‰ até 28‰ (HOLDICH; HARLIOĞLU; FIRKINS, 1997). Já quando *Pacifastacus leniusculus* foi exposto a diferentes salinidades por três semanas, a sua hemolinfa foi hiperregulada da água doce até 475 mOsm/ kg SW e conformou de 475 mOsm/ kg SW até 750 mOsm/ kg SW (WHEATLY; HENRY, 1987). Essa diferença de padrões de resposta, encontrada para diferentes tempos de exposição em crustáceos hololimnéticos, pode estar relacionada a uma característica ancestral, mostrando que essas espécies ainda são capazes de preservar um comportamento hiporregulatório, para secretar sal, que pode ser considerado uma característica plesiomórfica em relação à hiperregulação em crustáceos do táxon Brachyura (MCNAMARA; FARIA, 2012) ou um comportamento osmoconformatório, responsável pela regulação do volume celular.

Em populações distintas da espécie de camarão diádromo *Macrobrachium amazonicum* foi encontrado diferente padrão de osmorregulação. A população do Delta do Amazonas mostrou um padrão de regulação hiper-hiposmótica, hiperregulando até 17‰ e hiporregulando acima dessa salinidade; já a população do Pantanal apresentou um padrão de regulação hiper-isosmótica, hiperregulando também até 17‰ e conformando acima dessa salinidade (CHARMANTIER; ANGER, 2011). Para esses autores, a capacidade de hiperregular em água doce deve ser uma característica chave para a transição evolucionária para um ciclo de vida hololimnético e a capacidade de hiporregular pode não ter um valor adaptativo em ambientes límnicos, podendo então, ser perdida ao longo da evolução, já que estes organismos de água doce nunca usem tal mecanismo. Essa perda da capacidade de hiporregular já foi demonstrada em três espécies do gênero *Macrobrachium*: camarão hololimnético *Macrobrachium australiense* (DENNE, 1968), camarão

diádromo *Macrobrachium nipponense* (WANG *et al.*, 2004) e camarão hololimnético *Macrobrachium tuxtilaense* (ORDIANO; ALVAREZ; ALCARAZ, 2005).

Porém a espécie *A. schmitti*, embora esteja há aproximadamente $33,2 \pm 1,8$ milhões vivendo em água doce e não enfrente nenhuma variação de salinidade no meio em que vive, essa espécie mostrou que ainda preserva mecanismos osmorregulatórios de seus ancestrais marinhos e pode ser considerada eurialina, assim como outros crustáceos dulcícolas, pois consegue sobreviver e hiperregular a osmolalidade da sua hemolinfa na água doce até às salinidades de 21‰ (um dia) ou 23‰ (dez dias) e hiporregular acima dessas salinidades (um e dez dias) ou conformar a osmolalidade em salinidades entre 20‰ e 25‰ (cinco dias).

A concentração de sódio da hemolinfa de *A. schmitti* aumentou acompanhando a elevação da osmolalidade após exposição a diferentes salinidades. Após um e cinco dias de exposição, a concentração de sódio manteve-se inalterada até a salinidade de 15‰ e aumentou nas salinidades de 20‰ (gradiente de 0,8:1 e aumento de 15,7% em um dia; gradiente de 0,8:1 e aumento de 13,8% em cinco dias) e 25‰ (gradiente de 0,8:1 e aumento de 29,9% em um dia; gradiente de 0,7:1 e aumento de 23,2% em cinco dias) em comparação ao controle em água doce (gradiente de 29:1). Após dez dias de exposição a concentração de sódio aumentou nas salinidades de 15‰ (gradiente de 1,1:1 e aumento de 13,4%), 20‰ (gradiente de 0,9:1 e aumento de 23,9%) e 25‰ (gradiente de 0,8:1 e aumento de 28,7%) em comparação ao controle em água doce. Na salinidade de 35‰ após doze horas de exposição a concentração de sódio aumentou 62,7% (gradiente de 0,7:1) em comparação ao controle em água doce. Esses aumentos encontrados na concentração de sódio estão relacionados com grandes alterações que ocorrem no gradiente entre o LEC e a água devido ao aumento da salinidade e também ao tempo de exposição e, por estarem bem adaptadas à água doce, a espécie *A. schmitti*, assim como outras espécies de crustáceos hololimnéticos, possivelmente apresenta alguma deficiência nos mecanismos de secreção de NaCl (FALEIROS, 2011).

Na salinidade de 15‰ a concentração de sódio aumenta após cinco dias de exposição e permanece sem alterações significativas até dez dias. Na salinidade de 20‰, a concentração de sódio permanece sem alterações significativas de um até

cinco dias e aumenta após dez dias de exposição. Porém, na salinidade de 25‰, a concentração de sódio permaneceu inalterada de um dia até dez dias de exposição. O caranguejo hololimnético *Dilocarcinus pagei* quando exposto a salinidade de 25‰ aumentou a concentração de sódio da sua hemolinfa de 214 ± 20 mM (gradiente de 30,6:1 na água doce) para 504 ± 16 mM (gradiente de 1,44:1 e aumento de 135,5%) após um dia de exposição e, assim como ocorreu com *A. schmitti*, a concentração de sódio permaneceu inalterada de um até dez dias de exposição (AUGUSTO *et al.*, 2007b). Esses resultados mostram que espécies de crustáceos hololimnéticas tentam manter a concentração de sódio constante na hemolinfa, no período entre um e dez dias, mesmo com o aumento da salinidade, possivelmente para impedir que a osmolalidade da hemolinfa aumente e altere os gradientes entre o LEC e a água.

A concentração de cloreto de *A. schmitti* acompanhou o aumento da osmolalidade e do sódio da hemolinfa. Após um e dez dias de exposição, a concentração de cloreto aumentou nas salinidades de 15‰ (gradiente de 0,9:1 e aumento de 25,3% em um dia; gradiente de 0,9:1 e aumento de 44,2% em dez dias) e de 20‰ (gradiente de 0,8:1 e aumento de 44,9% em um dia; gradiente de 0,8:1 e aumento de 67,9% em dez dias) e manteve-se sem alterações significativas até a salinidade de 25‰ (gradiente de 0,6:1 e aumento de 49,4% em um dia; gradiente de 0,6:1 e aumento de 62,8% em dez dias). Após cinco dias de exposição, a concentração de cloreto aumentou nas salinidades de 15‰ (gradiente de 0,9:1 e aumento de 52,2%), de 20‰ (gradiente de 0,8:1 e aumento de 72%) e de 25‰ (gradiente de 0,7:1 e aumento de 73,9%), todos em comparação ao controle em água doce (gradiente de 19,6:1). Na salinidade de 35‰ a concentração de cloreto aumentou 93,2% (gradiente de 0,6:1) em comparação à água doce, após doze horas de exposição. Na espécie *Aegla franca* a concentração de cloreto também aumentou de $203,5 \pm 8,6$ mM (gradiente de 25,4:1) na água doce para $285,3 \pm 9,5$ mM (gradiente de 0,9:1 e aumento de 40,2%) na salinidade de 20‰ e para $341,3 \pm 6,7$ mM (gradiente de 0,9:1 e aumento de 67,7%) na salinidade de 25‰, após cinco dias de exposição (FARIA; AUGUSTO; MCNAMARA, 2011). O caranguejo hololimnético *Dilocarcinus pagei* exposto à salinidade de 25‰ aumentou a concentração de cloreto de 226 ± 13 mM (gradiente de 28,2:1 na água doce) para 304 ± 9 mM (gradiente de 0,8:1 e aumento de 34,5%) após um dia e para 351 ± 13 mM

(gradiente de 0,9:1 e aumento de 55,3%) após cinco dias, permanecendo com a mesma concentração de cinco até dez dias (AUGUSTO *et al.*, 2007b). Os resultados do presente estudo realizado com *A. schmitti* e dos trabalhos realizados com *Aegla franca* e *Dilocarcinus pagei* mostram que espécies de crustáceos hololimnéticos estão bem adaptadas à água doce e, por não enfrentarem alterações de salinidade no meio em que vivem, não conseguem manter o gradiente entre o LEC e a água com o aumento da salinidade, possivelmente devido a uma baixa capacidade de secreção de NaCl, que pode estar relacionado com a ausência do simportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ basolateral (FALEIROS, 2011).

A concentração de potássio de *A. schmitti* permaneceu sem alterações significativas no controle em água doce até a salinidade de 15‰ e aumentou na salinidade de 20‰ (aumentou 49,5%), mantendo-se sem alterações na salinidade de 25‰ (aumentou 36,3% em comparação à água doce) no tempo de um dia. Nos tempos de cinco e dez dias, a concentração de potássio também não mostrou alterações significativas no controle em água doce até a salinidade de 20‰ e aumentou na salinidade de 25‰ (aumentou 40,9 % em cinco dias e 68,9% em dez dias). Na salinidade de 25‰ a concentração de potássio também não teve alterações significativas nos tempos de um e cinco dias, mas aumentou depois de dez dias. Já na salinidade de 35‰ após doze horas a concentração de potássio aumentou 92,3% (17,5 mM) em comparação ao controle em água doce (9,1 mM). Resultados semelhantes foram encontrados no lagostim *Pacifastacus leniusculus*, que também manteve a concentração de potássio relativamente constante (≈ 5 mM) na água doce até a salinidade de 18,4‰ e, em seguida, houve um aumento para 7 mM na salinidade de 24,5‰ (aumentou 40%), após dois dias de exposição (KERLEY; PRITCHARD, 1967). Os mecanismos envolvidos na regulação da concentração de potássio na hemolinfa de crustáceos ainda não são muito bem compreendidos (NOVO; MIRANDA; BIANCHINI, 2005). Porém, a glândula antenal pode estar relacionada com a estabilidade na concentração de potássio e tem um papel importante na reabsorção de potássio para a produção de urina primária em alguns crustáceos (DEHNEL; CAREFOOT, 1965; LIN; LIOU; CHENG, 2000).

Porém, a concentração de potássio de *A. schmitti* diminuiu após cinco dias de exposição na salinidade de 15‰ em comparação a um e a dez dias e na salinidade de 20‰ após cinco dias em comparação a um dia. O caranguejo

diádromo *Eriocheir sinensis* também diminuiu a concentração de potássio de aproximadamente 6 mM na água doce para aproximadamente 5 mM nas salinidades de 14‰, 21‰, 28‰ e 35‰, após três dias de exposição (WANG *et al.*, 2012). Essa diminuição na concentração de potássio, tanto para *A. schmitti* quanto para *Eriocheir sinensis* pode estar relacionada com a ativação de mecanismos de RII, uma vez que ambas as espécies conformaram a sua hemolinfa em salinidades acima de 20‰ (*A. schmitti*) em cinco dias e acima de 28‰ em três dias (*Eriocheir sinensis*). O íon potássio também funciona como osmólito intracelular e está envolvido no mecanismo de RII, por isso deve ser regulado para minimizar o movimento de água entre o meio intracelular e o meio extracelular, mantendo a hemolinfa isosmótica em relação ao meio externo e, dessa forma, regula o volume celular (MCNAMARA *et al.*, 2004).

A concentração de magnésio de *A. schmitti* manteve-se sem alterações significativas da água doce até a salinidade de 15‰ e aumentou nas salinidades de 20‰ (aumentou 136,7%) e 25‰ (aumentou 158,3%) após um dia de exposição. Nos tempos de cinco e dez dias a concentração de magnésio aumentou nas salinidades de 15‰ (aumentou 173,8% em cinco dias e 112,9% em dez dias), 20‰ (aumentou 247,6% em cinco dias e 138,7% em dez dias), 25‰ (aumentou 264,3% em cinco dias e 148,4% em dez dias), em comparação ao controle em água doce. Na salinidade de 15‰, a concentração de magnésio aumentou após cinco e dez dias, em comparação com um dia de exposição. Na salinidade de 35‰, a concentração de magnésio aumentou 313,3% em comparação ao controle em água doce após doze horas de exposição. A espécie *A. schmitti* mostrou que é capaz de regular esse íon mesmo com a elevação de salinidade. Assim como outros crustáceos de água doce, que também mostraram um padrão semelhante. Após dez dias de exposição, os camarões diádromo *Macrobrachium olfersii* e hololimnético *Macrobrachium potiuna* também aumentaram as suas concentrações de magnésio em relação à água doce (<0,5‰), nas salinidades de 20‰ (5,2 mM; aumentou 147,6%) e 32‰ (2,5 mM; aumentou 168,8%), respectivamente. (FREIRE *et al.*, 2003). O lagostim *Pacifastacus leniusculus* aumentou a concentração de magnésio da sua hemolinfa de aproximadamente 3 mM em água doce para ≈8 mM (aumentou 116,7%) na salinidade de 350 mOsm/ kg SW (11,7‰) e para ≈20 mM (aumentou 566,7%) na salinidade de 750 mOsm/ kg SW (25‰), após três semanas de exposição

(WHEATLY; HENRY, 1987). Esses estudos mostram que a concentração de magnésio aumenta mais com o aumento da salinidade e também com o tempo maior de exposição e, esse aumento da concentração de magnésio pode estar relacionado a uma diminuição na atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e H^+ -ATPase, uma vez que o íon magnésio tem uma função importante, pois serve como cofator para muitas enzimas que estão envolvidas na transferência de grupos fosfatos, como ATPases, fosfatases e cinases (PERRY; GREY, 1956; FIDEU *et al.*, 1985; MORRIT; SPICER, 1993; FREIRE *et al.*, 2003).

Nos crustáceos, o magnésio é regulado pelo processo de ultrafiltração que acontece na glândula antenal, para que, em seguida, esse íon seja secretado na urina (RIEGEL; LOCKWOOD, 1961; FREIRE; ONKEN; MCNAMARA, 2008). No caranguejo *Hemigrapsus nudus* a glândula antenal regula a concentração de magnésio para níveis hipotônicos, sugerindo que esse processo seja necessário para facilitar a transmissão de impulso neuromuscular (DEHNEL; CAREFOOT, 1965).

O teor hídrico no músculo abdominal de *A. schmitti* manteve-se inalterado em todos os tempos e todas as salinidades, mesmo com o aumento da osmolalidade da hemolinfa, inclusive na salinidade de 35‰ ($78,07 \pm 1,23$ %) após doze horas de exposição. A única exceção aconteceu na salinidade de 25‰ ($75,05 \pm 0,7$ %) durante cinco dias de exposição, que houve uma redução significativa em relação ao controle em água doce ($79,74 \pm 0,75$ %). Essa redução do teor hídrico na salinidade de 25‰ está relacionada com um maior aumento da osmolalidade da hemolinfa observado nesse estudo, que foi de $806 \pm 28,41$ mOsm/kg H_2O nessa salinidade.

Estudos *in vivo* também foram realizados com a espécie *A. schmitti* e o teor hídrico muscular permaneceu inalterado tanto na água doce ($79,9 \pm 0,9$ %) quanto na salinidade de 15‰ ($80,2 \pm 1,9$ %), após sete horas de exposição (FREIRE *et al.*, 2008).

Porém, estudos *in vitro* realizados com *A. schmitti* (FREIRE *et al.*, 2008) e *A. parana* (FREIRE *et al.*, 2013) quando submetidas ao choque hiperosmótico, reduziram em aproximadamente 10% o peso úmido muscular e não conseguiram retornar aos valores controle em água doce, mostrando que essas duas espécies

apresentam alguma deficiência na Regulação Isosmótica Intracelular (FREIRE *et al.*, 2013).

Outros crustáceos de água doce também mostraram resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo. O lagostim *Pacifastacus leniusculus* não teve alterações no teor hídrico muscular durante dois dias na água doce ($81,19 \pm 0,52\%$) e nas salinidades de 6,1‰ ($81,97 \pm 0,23\%$), 12,3‰ ($81,93 \pm 1,17\%$), 18,4‰ ($81,32 \pm 0,56\%$), 21,5‰ ($80,26 \pm 0,58\%$), 24,5‰ ($81,75 \pm 0,46\%$) e 30,67‰ ($79,96 \pm 0,46\%$) (KERLEY; PRITCHARD, 1967). O caranguejo *Dilocarcinus pagei* manteve o teor hídrico muscular inalterado ($\approx 80\%$) após dez dias de exposição nas salinidades de $<0,5\%$, de 15‰, de 20‰, de 25‰ e de 30‰ (AUGUSTO *et al.*, 2007b). O camarão diádromo *M. nipponense* também não apresentou alterações no teor hídrico muscular após ser exposto durante quatorze dias em 0‰ ($79,1 \pm 0,5\%$), 7‰ ($78,3 \pm 0,7\%$), 14‰ ($78,2 \pm 0,9\%$) e 20‰ ($78,1 \pm 0,3\%$) (WANG *et al.*, 2004).

A espécie *A. schmitti*, mesmo sendo considerada um antigo invasor de água doce, parece que ainda é capaz de regular o volume celular através de mecanismos de Regulação Isosmótica Intracelular, uma vez que, conseguiu recuperar o teor hídrico muscular no período entre cinco dias ($75,05 \pm 0,7\%$) e dez dias ($80,67 \pm 0,9\%$) quando exposta à salinidade 25‰.

Esse estudo foi o primeiro a medir a atividade da enzima anidrase carbônica de uma espécie da família Aeglidæ. A atividade da Anidrase Carbônica na espécie *A. schmitti* não teve alteração com o aumento da salinidade em relação ao controle, em nenhum tempo de exposição, exceto na salinidade de 35‰ por doze horas, que a atividade dessa enzima teve uma redução de $2,2 \pm 0,19$ /mg de proteína (controle em água doce) para $1,4 \pm 0,06$ /mg de proteína (reduziu 63,3%).

Assim com ocorreu com *A. schmitti*, a atividade da anidrase carbônica do camarão diádromo de água doce *Macrobrachium acanthurus* também permaneceu inalterada em aproximadamente 2,2 /mg de proteína em água doce e na salinidade de 25‰, após um dia de exposição (MARASCHI; FREIRE; PRODOCIMO, 2015). Resultados semelhantes também foram observados nas brânquias posteriores do caranguejo diádromo *Eriocheir sinensis* que não apresentou mudanças na atividade da anidrase carbônica nas salinidades de 0,3‰, 7‰, 14‰ e 21‰ após três dias de exposição. Entretanto, a atividade da anidrase carbônica foi significativamente maior

na salinidade de 7‰ (≈ 270 U/ mg de proteína) em comparação com as salinidades de 28‰ (≈ 180 U/ mg de proteína) e 35‰ (≈ 170 U/ mg de proteína) (WANG *et al.*, 2012). Uma explicação para a atividade da anidrase carbônica se manter inalterada pode estar associada a outra função dessa enzima, que também é responsável pelo equilíbrio ácido-base (FREIRE; ONKEN; MCNAMARA, 2008; HENRY *et al.*, 2012). Mantendo a atividade da anidrase carbônica inalterada, *A. schmitti* pode evitar o desenvolvimento de uma acidose metabólica, devido a uma redução do íon HCO_3^- , como ocorreu com o lagostim *Pacifastacus leniusculus*, quando transferido da água doce para 26,25‰ após dois dias de exposição (WHEATLY; MCMAHON, 1982).

6 CONCLUSÃO

A espécie hololimnética *Aegla schmitti*, que vive há aproximadamente 33,2 milhões de anos na água doce e não enfrenta alterações de salinidade no meio em que vive, mostrou que ainda preserva mecanismos osmorregulatórios para sobreviver em águas salinas e pode ser considerada eurialina. Essa espécie apresentou uma grande plasticidade osmorregulatória, conseguindo sobreviver com uma alta taxa de sobrevivência por até dez dias na salinidade de 25‰ e por até doze horas na salinidade de 35‰. *A. schmitti* mostrou diferentes padrões de resposta quando exposta às salinidades entre 20‰ e 25‰, osmoconformando a osmolalidade da sua hemolinfa após cinco dias e hiporregulando após um dia (entre 21‰ e 25‰) e dez dias (entre 23‰ e 25‰). Essa espécie também mostrou que é capaz de manter o teor hídrico muscular inalterado, mesmo com o aumento da osmolalidade da hemolinfa, indicando que ainda possui a capacidade de regular o volume celular. Esse estudo também foi o primeiro a medir a atividade da enzima anidrase carbônica de uma espécie da família Aeglidae. A atividade dessa enzima manteve-se inalterada, mesmo com o aumento da osmolalidade da hemolinfa em todas as salinidades e todos os tempos de exposição, possivelmente devido a função que essa enzima realiza no equilíbrio ácido-base. A única exceção ocorreu na salinidade de 35‰ após doze horas, quando a atividade da anidrase carbônica reduziu 63,3% em relação à água doce. Esse estudo foi extremamente importante para entender melhor os mecanismos fisiológicos envolvidos na osmorregulação dos crustáceos anomuros do gênero *Aegla*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, M.Y.; PAVASOVIC, A.; MATHER, P.B.; PRENTIS, P.J., Analysis, characterization and expression of gill-expressed carbonic anhydrase genes in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Gene* 564, 176-187, 2015.

ARENAS, J. La cordillera de la costa como refugio de la fauna dulcícola preglacial. **Archivos de Biología y Medicina Experimentales** 10: 1-40, 1976.

AUGUSTO, A.; GREENE, L.J.; LAURE, H.J.; MCNAMARA, J.C. The ontogeny of isosmotic intracellular regulation in the diadromous, freshwater palaemonid shrimps, *Macrobrachium amazonicum* and *M. olfersi* (Decapoda). **Journal of Crustacean Biology** 27: 626-634, 2007a.

AUGUSTO, A.; GREENE, L.J.; LAURE, H.J.; MCNAMARA, J.C. Adaptive shifts in osmoregulatory strategy and the invasion of freshwater by brachyuran crabs: evidence from *Dilocarcinus pagei* (Trichodactylidae). **Journal of Experimental Zoology** 307A: 688-698, 2007b.

AUGUSTO, A.; PINHEIRO, A.S.; GREENE, L.J.; LAURE, H.J.; MCNAMARA, J.C. Evolutionary transition to freshwater by ancestral marine palaemonids: evidence from osmoregulation of in a tide pool shrimp. **Aquatic Biology** 7, 113-122, 2009.

BAHAMONDE, N.; LÓPEZ, M. T. Estudios biológicos em la población de *Aegla laevis laevis* (Latreille) de el Monte (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Investigaciones Zoológicas Chilenas**. 7: 19-58, 1961.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). **Archivos de Zoologia**. 2: 159-346, 1994.

BOND-BUCKUP, G. A família Aeglidae. p. 21-16 *In*. G. A. S. Melo, ed. **Manual de Identificação dos Crustacea Decapoda de Água Doce do Brasil**. Editora Loyola, São Paulo, 2003.

BORN, J.W. Osmoregulatory capacities of two caridean shrimps, *Syncaris pacifica* (Atyidae) and *Palaemon macrodactylus* (Palaemonidae). **Biological Bulletin** 134, 235-244, 1968.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.

BUENO, A.A.P.; BOND-BUCKUP, G. Natural diet of *Aegla platensis* Schmitt and *Aegla ligulata* Bond-Buckup & Buckup (Crustacea, Decapoda, Anomura) from Brazil. **Acta Limnologica Brasileira** 16: 115-127, 2004.

BUENO, S.L.S.; SHIMIZU, R.M.; ROCHA, S.S. Estimating the Population Size of *Aegla franca* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) by Mark-Recapture Technique from an Isolated Section of Barro Preto Stream, County of Claraval, State of Minas Gerais, Southeastern Brazil. **Journal of Crustacean Biology** Vol. 27, n. 4, pp. 553-559, 2007.

CAMPBELL, N.A.; REECE, J. B. **Biologia**. 8ª Ed. Artmed, São Paulo, 2010.

CASSINI, M.H.; FASOLA, L.; CHEHÉBAR, C.; MACDONALD, D.W. Scale-dependent analysis of an otter-crustacean system in Argentinean Patagonia. **Naturwissenschaften** 96: 593-599, 2009.

CHARMANTIER, G.; ANGER, K. Ontogeny of osmoregulatory patterns in the South American shrimp *Macrobrachium amazonicum*: loss of hypo-regulation in a landlocked population indicates phylogenetic separation from estuarine ancestors. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 396, 89-98, 2011.

COGO, G.B.; SANTOS, S. Grau de adaptação de *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura) ao ambiente dulcícola. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu, MG**, pp 1-2, 2007. <http://www.seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/487.pdf>

COPELAND, D.E.; FITZJARRELL, A.T. The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus*, Rathbun) with notes on modified mitochondria. **Zeitschrift für Zellforschung** 92, 1-22, 1968.

CRANDALL, K.A.; BUHAY, J.E. Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae - Decapoda) in freshwater. **Hydrobiologia** 595: 295-301, 2008.

DALOSTO, M.; SANTOS, S. Differences in oxygen consumption and diel activity as adaptations related to microhabitat in Neotropical freshwater decapods (Crustacea). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A. 160: 461-466, 2011.

DE GRAVE, S.; CAI, Y.; ANKER, A. Global diversity of shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) in freshwater. **Hydrobiologia** 595: 287-293, 2008.

DEHNEL, P.A.; CAREFOOT, T.H. Ion regulation in two species of intertidal crabs. **Comparative Biochemistry and Physiology** 15, 377- 397, 1965.

DENNE, L.B. Some aspects of osmotic and ionic regulation in the prawns *Macrobrachium australiense* (Holthuis) and *M. equidens* (Dana). **Comparative Biochemistry and Physiology** 26: 17-30, 1968.

FALEIROS, R.O. **Osmorregulação em camarões Palaemonidae (Decapoda, Caridea): uma abordagem molecular e bioquímica**. 114p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

FARIA, S.C.; AUGUSTO, A.S.; MCNAMARA, J.C. Intra- and extracellular osmotic regulation in the hololimnetic Caridea and Anomura: a phylogenetic perspective on the conquest of fresh water by the decapod Crustacea. **Journal of Comparative Physiology** 181B: 175-186, 2011.

FELDMANN, R.M. *Haumuriaegla glaessneri* n. gen. and n. sp. (Decapoda, Anomura, Aeglididae) from Haumurian (Late Cretaceous) Rock near Cheviot, New Zealand. **New Zealand Journal of Geology and Geophysics**. 27: 379-385, 1984.

FELDMANN, R.M.; VEGA, F.J.; APPLEGATE, S.P.; BISHOP, G.A. Early Cretaceous arthropods from the Tlayúa Formation at Tapexi de Rodríguez, Puebla, México. **Journal of Paleontology**. 72 (1): 79-90, 1998.

FIDEU, M.D.; HERRANZ, M.J.; RUIZ-ANIL, M.; PEREZ, M.L. Influence of ATP and magnesium on phosphofructokinase from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) liver. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B. 81, 1067-1071, 1985.

FLORKIN, M. La regulation isoosmotique intracellulaire chez les invertébrés marins euryhalins. **Bulletin de la Classe des Sciences 5e Série Académie Royale de Belgique** 48: 687-694, 1962.

FREIRE, C.A.; CAVASSIN, F.; RODRIGUES, E.M.; TORRES, A.H.; MCNAMARA, J.C. Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 136: 771-778, 2003.

FREIRE, C.A.; ONKEN, H.; MCNAMARA, J.C. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 151: 272-304, 2008.

FREIRE, C.A.; AMADO, E.M.; SOUZA, L.R.; VEIGA, M.P.; VITULE, J.R.; SOUZA, M.M.; PRODOCIMO, V. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 149: 435-446, 2008.

FREIRE, C.A.; SOUZA-BASTOS, L.R.; AMADO, E.M.; PRODOCIMO, V.; SOUZA, M.M. Regulation of Muscle Hydration Upon Hypo- or Hyper-Osmotic Shocks: Differences Related to Invasion of the Freshwater Habitat by Decapod Crustaceans. **Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology**, v. 319, p. 297-309, 2013.

HARRIS, R.R.; MICALLEF, H. Osmotic and ionic regulation in *Potamon edulis*, a freshwater crab from Malta. **Comparative Biochemistry and Physiology** 38A: 769-776, 1971.

HENRY, R.P.; GARRELTS, E.E.; MCCARTY, M.M.; TOWLE, D.W. Differential induction of branchial carbonic anhydrase and Na⁺/K⁺-ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. **Journal of Experimental Zoology** 292, 595-603, 2002.

HENRY, R.P.; LUCU, C.; ONKEN, H.; WEIHRAUCH, D. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid–base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. **Frontiers in Physiology**, 3, 1-33, 2012.

HOLDICH, D.M.; HARLIOĞLU, M.M.; FIRKINS, I. Salinity adaptations of crayfish in British waters with particular reference to *Austropotamobius pallipes*, *Astacus leptodactylus* and *Pacifastacus leniusculus*. **Estuarine, Coastal and Shelf Science** 44: 147-154, 1997.

JASMANI, S.; JAYASANKAR, V; WILDER, M.N. Carbonic anhydrase and Na/K-ATPase activities at different molting stages of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Fisheries Science** 74: 488-493, 2008.

KERLEY, D.E.; PRITCHARD, A.W. Osmotic regulation in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, stepwise acclimated to dilutions of sea water. **Comparative Biochemistry and Physiology** 20: 101-113, 1967.

KIRSCHNER, L.B. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. **Journal of Experimental Biology** 207: 1439-1452, 2004.

KHODABANDEH, S.; KUTNIK, M.; AUJOULAT, F.; CHARMANTIER, G.; CHARMANTIER-DAURES, M. Ontogeny of the antennal glands in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase. **Cell and Tissue Research** 319: 67-174, 2005.

LARSEN, E.H.; DEATON, L.E.; ONKEN, H.; O'DONNELL, M.; GROSELL, M.; DANTZLER, W.H.; WEIHRAUCH, D. Osmoregulation and Excretion. **Comprehensive Physiology** 4: 405-573, 2014.

LIMA, A.G.; MCNAMARA, J.C.; TERRA, W.R. Regulation of hemolymph osmolytes and gill Na⁺/K⁺-ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 215, 81-91, 1997.

LIN, S.C.; LIOU, C.H.; CHENG, J.H. The role of the antennal glands in ion and body volume regulation of cannulated *Penaeus monodon* reared in various salinity conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A** 127: 121-129, 2000.

LOOCKWOOD, A.P.M. Transport and osmoregulation in Crustacea. Em: **Transport of ions and water in animals**. Pp: 673-707. Academic Presss.London, 1977.

LUCU, C.; TOWLE, D.W. Na⁺/K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A** 135, 195-214, 2003.

LUQUET, C.M.; POSTEL, U.; HALPERIN, J.; URCOLA, M.R.; MARQUES, R.; SIEBERS, D. Transepithelial potential differences and Na⁺ flux in isolated perfused gills of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Grapsidae) acclimated to hyper- and hypo-salinity. **Journal of Experimental Biology** 205, 71-77, 2002a.

MANTEL, L.H.; FARMER, L.L. The biology of Crustacea. In: Bliss DE (ed) **Internal anatomy and physiological regulations**. Academic Press, London, pp 53-161, 1983.

MARASCHI, A. C.; FREIRE, C. A.; PRODOCIMO, V. Immunocytochemical localization of V-H⁺-ATPase, Na⁺/K⁺-ATPase, and carbonic anhydrase in gill lamellae of adult freshwater euryhaline shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology**, v. 9999, 2015.

MARCHIORI, A. B.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M.L.; SANTOS, S. Intraspecific variation in *Aegla longirostri* (Crustacea: Decapoda: Anomura) revealed by geometric morphometrics: evidence for ongoing speciation? **Biological Journal of the Linnean Society** 112: 31-39, 2014.

MARTIN, J.W.; ABELE, L.G. External morphology of the genus *Aegla* (Crustacea: Anomura: Aeglidae). **Smithsonian contributions to zoology**, n. 453. Smithsonian Institution Press, Washington D. C., 46 p, 1986.

MCNAMARA, J.C.; ROSA, J.C.; GREENE, L.J.; AUGUSTO, A.S. Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimatation. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology** 37:193-208, 2004.

MCNAMARA, J.C.; FARIA, S.C. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. **Journal of Comparative Physiology B** 182: 997-1014, 2012.

MITCHELL, R.T.; HENRY, R.P. Carbonic anhydrase induction in euryhaline crustaceans is rate-limited at the post-transcriptional level. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology** 169, 15-23, 2014.

MORRIT, D.; SPICER, J.I. Mini review: a brief reexamination of the function and regulation of extra-cellular magnesium and its relationship to activity in crustacean arthropods. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A** 106, 19-23, 1993.

MORRONE, J.J.; LOPPRETTO, E.C. Distributional patterns of freshwater Decapoda (Crustacea: Malacostraca) in southern South America: A panbiogeographic approach. **Journal of Biogeography** 21: 97-109, 1994.

NEUFELD, G.J.; HOLLIDAY, C.W.; PRITCHARD, J.B. Salinity adaption of gill Na^+, K^+ -ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Journal of Experimental Zoology** 211, 215-224, 1980.

NOVO, M.S.; MIRANDA, R. B.; BIANCHINI, A. Sexual and seasonal variations in osmoregulation and ionoregulation in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Crustacea, Decapoda). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 323: 118-137, 2005.

ONKEN, H., RIESTENPATT, S. NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs, transport mechanisms and their regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 119, 883-893, 1998.

ORDIANO, A.; ALVAREZ, F.; ALACARAZ, G. Osmoregulation and oxygen consumption of the hololimnetic prawn, *Macrobrachium tuxtilaense* at varying salinities (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana** 78, 1013-1022, 2005.

ORTMANN, A.E. The geographical distribution of freshwater decapods and its bearing upon ancient geography. **Proceedings of the American Philosophical Society**, 41: 267-400, 1902.

PÉQUEUX, A. Osmotic regulation in crustaceans. **Journal of Crustacean Biology** 15: 1-60, 1995.

PÉREZ-LOSADA, M.; BOND-BUCKUP, G.; JARA, C.G.; CRANDALL, K.A. Molecular systematics and biogeography of the southern South American freshwater "crabs" *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) using multiple heuristic tree search approaches. **Systematic Biology**. 53 (5): 767-780, 2004.

PERRY, S.V.; GREY, T.C. A study of the effects of substrate concentration and certain relaxing factors on magnesium activated myofibrillar adenosinetriphosphatase. **Biochemical Journal** 64, 184-192, 1956.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Eckert Fisiologia Animal-Mecanismos e Adaptação**. Quarta Edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

RATHMAYER, M.; SIEBERS, D. Ionic balance in the freshwater-adapted Chinese crab, *Eriocheir sinensis*. **Journal of Comparative Physiology B** 171: 271-281, 2001.

RIEGEL, J.A.; LOCKWOOD, A.P.M. The role of the antennal gland in the osmotic and ionic regulation of *Carcinus maenas*. **Journal of Experimental Biology** 38: 491-499, 1961.

RIEGEL, J.A. Micropuncture studies of the concentrations of sodium, potassium and inulin in the crayfish antennal gland. **Journal of Experimental Biology** 42: 379-384, 1964.

RINGUELET, R.A. Consideraciones sobre las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Aegla* Leach (Decápodos, Anomuros). **Notas del Museo de La Plata**, 14: 111-118, 1949.

RODRIGUES, W.; HEBLING, N.J. Estudos biológicos em *Aegla perobae* Hebling & Rodrigues, 1977 (Decapoda, Anomura). **Revista Brasileira de Biologia** 38 (2): 383-390, 1978.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. Sétima edição. Editora Roca, São Paulo. 1145 p, 2005.

SANTOS, S.; AYRES-PERES, L.; CARDOSO, R.C.F.; SOKOLOWICZ, C.C. Natural diet of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aeglidae). **Journal of Natural History**. 42: (13-14): 1027-1037, 2008.

SANTOS, S.; JARA, C.G.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M.L.; PÉREZ-LOSADA, M.; CRANDALL, K.A. New species and records of the genus *Aegla* Leach, 1820 (Crustacea, Anomura, Aeglidae) from the West-Central region of Rio Grande do Sul, Brazil. **Nauplius** 21(2): 211-223, 2013.

SANTOS, S.; BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M.L.; PÉREZ-LOSADA, M.; JARA, C.G.; CRANDALL, K.A. Three new species of

Aeglidae (*Aegla* Leach, 1820) from Paraná State, Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v. 35 (6), p. 839-849, 2015.

SARVER, R.G.; FLYNN, M.A.; HOLLIDAY, C.W. Renal Na⁺,K⁺-ATPase and osmoregulation in the crayfish, *Procambarus clarkii*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 107: 349-356, 1994.

SCHMITT, W.L. The species of *Aegla*, endemic South American freshwater crustaceans. **Proceedings of the United States National Museum** 91 (3132): p. 431-524, 1942.

SERRANO, L.; HALANYCH, K.M.; HENRY, R.P. Salinity-stimulated changes in expression and activity of two carbonic anhydrase isoforms in the blue crab *Callinectes sapidus*. **Journal of Experimental Biology** 210, 2320-2332, 2007.

SHAW, J. Solute and water balance in the muscle fibres of the east African freshwater crab, *Potamon niloticus* (M. Edw). **Journal of Experimental Biology** 36: 145-156, 1959.

STERN S.; BORUT, A.; COHEN, D. Osmotic and ionic regulation of the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) adapted to varying salinities and ionic concentrations. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 86, 373-379, 1987.

TAVARES, C.; SEREJO, C.; MARTIN, J.W. A preliminary phylogenetic analysis of the Dendrobranchiata based on morphological characters. In: Martin JW, Felder DL, Crandall KA (eds) Decapod crustacean phylogenetics, **Crustacean issues** 18. CRC Press, Boca Raton, 262-274, 2009.

VITALE, A.M.; MONSERRAT, J.M.; CASTILHO, P.; RODRIGUEZ, E.M. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 122, 121-129, 1999.

WANG, W.N.; WANG, A.L.; BAO, L.; WANG, J.P.; LIU, Y.; SUN, R.Y. Changes of protein-bound and free amino acids in the muscle of the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense* in different salinities. **Aquaculture** 233: 561-571, 2004.

WANG, R.F.; ZHUANG, P.; FENG, G.P.; ZHANG, L.Z.; HUANG, X.R.; JIA, X.Y. Osmotic and ionic regulation and Na⁺/K⁺-ATPase, carbonic anhydrase activities in mature Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* exposed to different salinities. **Crustaceana** 85: 1431-1447, 2012.

WHEATLY, M. G.; HENRY, R. P. Branchial and antennal gland Na⁺/K⁺-dependent ATPase and carbonic anhydrase activity during salinity acclimation of the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Experimental Biology** 133, 73-86, 1987.

WHEATLY, M.G.; MCMAHON, B. R. Responses to hypersaline exposure in the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*. I. The interaction between ionic and acid-base regulation. **Journal of Experimental Biology** 99, 425-445, 1982.

WILDER, M.N.; HUONG, D.T.T.; ATMOMARSONO, M.; HIEN, T.T.T.; PHU, T.Q.; YANG, W-J. Characterization of Na/K-ATPase in *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of changing salinity on enzymatic activity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A** 25: 377-388, 2000.

WILLINER, V. Foregut ossicles morphology and feeding of the freshwater anomuran crab *Aegla uruguayana* (Decapoda, Aeglidae). **Acta Zoologica (Stockholm)**. 91: 408-415, 2010.

WILLMER, P.; STONE, G.; JOHNSTON, I. **Environmental physiology of animals**. Second edition. Blackwell Science, Oxford, U.K. 754 p, 2005.

YEO, D.C.J.; NG, P.K.L.; CUMBERLIDGE, N.; MAGALHÃES, C.; DANIELS, S.R.; CAMPOS, M.R. Global diversity of crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) in freshwater. **Hydrobiologia** 595: 275-286, 2008.